

Die Entwicklung des Innenohrs: Funktionelle Untersuchungen im Hühnerembryo

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Heike Herbrand
aus Düsseldorf

1. Referentin: PD Dr. Eva Bober

2. Referent: Prof. Dr. Hans-Henning Arnold

eingereicht am: 12.02.01

mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.04.01

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, Frau Privatdozentin Dr. Eva Bober, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Heike Herbrand, Sarah Guthrie, Thorsten Hadrys, Sonja Hoffmann, Hans-Henning Arnold, Silke Rinkwitz-Brandt, Eva Bober (1998) Two regulatory genes, cNkx5-1 and cPax2, show different responses to local signals during otic placode and vesicle formation in the chick embryo. Development 125, 645-654

Maja Adamska, Heike Herbrand, Marcin Adamski, Markus Krüger, Thomas Braun, Eva Bober. FGFs control the growth and patterning of the otocyst, but are not able to induce full ear program. Eingereicht zur Publikation.

Tagungsbeiträge (Poster):

Heike Herbrand, Sarah Guthrie, Thorsten Hadrys, Sonja Hoffmann, Hans-Henning Arnold, Silke Rinkwitz-Brandt, Eva Bober (1998) Regulatory genes cNkx5-1, cPax2 and BMP4 show different responses to local signaling during otic vesicle formation in the chick embryo. European Research Conferences, The genetic control of morphogenesis, Lenggries - Germany.

Datenbankeinträge:

Die cDNA-Sequenz für Hühnchen Nkx5-1 (acc.# Y15989) wurde in die EMBL Nukleinsäuredatenbank eingetragen.

Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I-III
II	Zusammenfassung.....	IV
1.	Einleitung	1
1.1	Bau und Funktion des Innenohrs.....	1
1.2	Das Innenohr entwickelt sich aus einer ektodermalen Plakode.	3
1.3	Gewebeinteraktionen und Genaktivitäten induzieren die Ohrplakode und steuern frühe Musterbildungsprozesse.	5
1.3.1	Mesendodermale Signale induzieren die Ohrplakode.....	5
1.3.2	Der Einfluß des Hinterhirns auf die Ohrentwicklung.	8
1.3.3	Spezifizierung von Regionen und Zellschicksalen	10
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2.	Material und Methoden.....	15
2.1	Bezugsquellen	15
2.2	Puffer und Stammlösungen	16
2.3	Antibiotika	17
2.4	Bakterienstämme.....	17
2.5	Verwendete Plasmidkonstrukte zur Generierung von <i>in situ</i> - Hybridisierungsproben.....	18
2.6	Allgemeine gentechnische Verfahren	19
2.7	Arbeiten mit Hühnchenembryonen	20
2.7.1	Inkubation von befruchteten Hühnereiern	20
2.7.2	Präparation von Hühnchenembryonen.....	20
2.7.3	Isolierung von Spendergewebe für Transplantationsexperimente	20
2.7.4	<i>In ovo</i> Manipulationen an Hühnchenembryonen	21
2.7.5	Explantation von embryonalem Hühnchengewebe.....	22
2.8	Zellbiologische Methoden.....	23
2.8.1	Passagierung und Kryokonservierung von Zellen	23
2.8.2	Kultivierung und Aggregation von Wachtel-Q2bn Zellen.....	23
2.8.3	Kultivierung und Aggregation von CHO.B3.A4-Zellen.....	24
2.9	Immunohistochemische Arbeitsmethoden	25
2.9.1	Whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	25
2.9.2	Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom	29
2.9.3	Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten.....	29

2.9.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Proben auf Gefrierschnitten.....	30
2.9.5	Herstellung von Paraffinschnitten.....	30
2.9.6	Immunohistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten	31
2.9.7	Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode	32
3.	Ergebnisse	34
3.1	Die Transkriptionsfaktoren cNkx5-1, SOHo und Pax2 sowie das Signalmolekül BMP4 werden in unterschiedlichen Bereichen des frühen Innenohrs exprimiert.....	34
3.2	Transplantation von Ohrektoderm an ektopische Positionen von Wirtsembryonen.....	39
3.2.1	Aspekte der Innenohrmorphogenese können in ektopischen Positionen entlang der Neuralachse ablaufen.	39
3.2.1.1	Transplantationen ins rostrale Hinterhirn.....	40
3.2.1.2	Transplantationen auf Höhe der Somiten 3/4.....	41
3.2.1.3	Transplantationen in die Flügelknospen	41
3.2.2	cNkx5-1, SOHo, Pax2, BMP4 und BMP7 zeigen eine unterschiedliche Abhängigkeit von lokalen Signalen während der Ausbildung des Ohrvesikels.....	43
3.2.2.1	In Ohrplakoden im rostralen Hinterhirn und Mittelhirn kann cNkx5-1 aktiviert werden und sein endogenes Muster rekonstituieren.	44
3.2.2.2	Ektopische Ohrvesikel zeigen keine normale Regionalisierung der Pax2-Transkripte.....	47
3.2.2.3	BMP4-Expression wird in ektopischen Vesikeln in zwei gegenüberliegenden Foci aufrecht erhalten.	49
3.2.2.4	SOHo-Expression wird in ektopischen Vesikeln aktiviert bzw. aufrecht erhalten, die Transkripte jedoch nicht korrekt lokalisiert.	50
3.2.2.5	BMP7-Expression wird in ektopischen Vesikeln im rostralen Hinterhirn oder Mittelhirn aufrecht erhalten.	51
3.2.3	Die Transkripte von cNkx5-1, BMP4 und SOHo werden in Ohrplakoden-Transplantaten nach posterior nicht korrekt lokalisiert.....	52
3.2.4	Transplantation in die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen.	53
3.3	cNkx5-1- und BMP4-Expression wird <i>in vitro</i> in Ohrgruben-Explantaten aufrecht erhalten.....	55
3.4	Implantation von Neuroektoderm ventrolateral der Ohrplakode führt nicht zu einer Einengung der cNkx5-1-Expressionsdomäne.	56

3.5	Die Implantation einer Goldbarriere zwischen Ohrplakode und Hinterhirn resultiert in verkleinerten Ohrvesikeln.	58
3.6	BMP und Noggin üben einen entgegengesetzten Einfluß auf die Innenohrmorphogenese aus.	60
3.6.1	Ektopische BMP-Quellen induzieren transiente epitheliale Strukturen im Innenohr.	61
3.6.2	Ektopische Noggin-Quellen blockieren die Innenohrmorphogenese im Ohrvesikelstadium.	62
3.6.3	BMP und Noggin bewirken entgegengesetzte Veränderungen im Expressionsmuster ohrspezifischer Gene.	63
3.6.4	BMP und Noggin erhöhen die Apoptoserate im Innenohrepithelium.	67
4.	Diskussion	70
4.1	Die Hühnchengene cNkx5-1 und Pax2 sind Orthologe von Nkx5-1 und Pax2 in der Maus.	70
4.2.1	Aspekte der frühen Innenohrmorphogenese werden in ektopischen Positionen nachvollzogen.	72
4.2.2	cNkx5-1 kann in Ohrplakodentransplantaten entlang der Neuralachse aktiviert werden.	75
4.2.3	Pax2 -Transkripte werden in ektopischen Vesikeln nicht regionalisiert.	76
4.2.4	BMP4, ein Marker prospektiver Sinnesepithelien, zeigt kein plastisches Verhalten.	79
4.2.5	SOHo, ein Mitglied der Nkx5-Homöoboxgenfamilie, zeigt ein anderes Verhalten als cNkx5-1.	80
4.3	Insertion einer Goldbarriere zwischen Hinterhirn und Ohrplakode führt möglicherweise zu einer Neuinduktion von Innenohrektoderm.	81
4.4.1	BMP2 und Noggin üben entgegengesetzte Effekte auf Morphogenese und frühe Musterbildungsprozesse im Innenohr aus.	83
4.4.2	BMP- und Noggin-Behandlung resultieren in einer erhöhten Apoptoserate im Innenohrepithelium.	86
4.4.3	BMPs und FGFs beeinflussen unterschiedliche Aspekte der frühen Innenohrmorphogenese.	87
5.	Literatur	90
6.	Anhang	102
	Abkürzungen.	102
	Lebenslauf	
	Dank	

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden frühe Musterbildungsprozesse im Innenohr des Hühnchens untersucht. Um einen genaueren Einblick in die komplexen regulatorischen Vorgänge zu erhalten, die die Morphogenese des Innenohrs steuern, wurden klassische embryologische Manipulationen mit der Analyse ohrspezifisch exprimierter Gene verknüpft.

Die Analyse basierte im Wesentlichen auf fünf Molekülen: Den Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren *cNkx5-1*, *Dlx5* und *SOHo*, die an der Morphogenese vestibulärer Strukturen beteiligt sind, dem „paired“-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor *Pax2*, der für die Entwicklung der Cochlea essentiell ist, und dem Signalmolekül *BMP4*, einem Marker prospektiver Sinnesepithelien.

Die Transplantation von Ohrplakoden verschiedener Entwicklungsstadien demonstrierte die schrittweise Determinierung des Ohrektoderms. Vor dem 10 Somitenstadium transplantierte Plakoden konnten sich nur in der Kopfgregion zu sphärischen Vesikeln zusammenschließen. Zu späteren Stadien transplantierte Plakoden bildeten dagegen auch in posterioren Abschnitten der Neuralachse Vesikel und entwickelten innerhalb der Kopfgregion sogar Anlagen für den endolymphatischen Gang, der als erstes morphologisches Kompartiment des Innenohrs spezifiziert zu werden scheint. Deutliche Unterschiede ergaben sich im Verhalten der untersuchten Gene. Die Expression von *BMP4* und *Nkx5-1* wurde in allen nach dem 10 Somitenstadium nach rostral transferierten Plakoden nachgewiesen. *BMP4*-Transkripte wurden dabei nicht der veränderten Orientierung der Plakode entsprechend relokalisiert, was auf eine frühe Determinierung der prospektiven Sinnesepithelien hinweist. Dahingegen waren *Nkx5-1*-Transkripte wie in den endogenen Vesikeln auf die laterale Wand beschränkt. *Pax2* zeigte hingegen in Bezug auf Aktivierung, Signalintensität und Transkriptverteilung kein einheitliches Verhalten. Diese Unterschiede deuten darauf hin, daß vestibuläre und auditive Innenohrstrukturen unabhängig voneinander festgelegt werden und die Morphogenese auditiver Strukturen stärker von lokalen Signalen abhängig ist.

Der Mechanismus der *Nkx5-1*-Regionalisierung auf die laterale Seite des Ohrvesikels wurde durch Implantation von Goldbarrieren zwischen Hinterhirn und Ohrplakode und durch Transplantation von zusätzlichem Neuroektoderm lateral der Ohrplakode untersucht. Die Hypothese, *Nkx5-1*-Transkripte könnten durch inhibitive Signale aus dem Hinterhirn auf die laterale Vesikelhälfte beschränkt werden, wurde durch die Ergebnisse dieser Experimente nicht bestätigt.

Explantationsstudien ergaben, daß sich Ohrektoderm im späten Ohrgrubenstadium auch in Abwesenheit der Nachbargewebe zu Ohrvesikeln mit einer Anlage für den endolymphatischen Gang weiterentwickeln kann. Die gegenüber der endogenen Situation diffuse Verbreiterung der *Nkx5-1*-Domäne weist darauf hin, daß die Aktivität des *Nkx5-1*-Gens im späten Ohrgrubenstadium zwar durch intrinsische Signale aufrecht erhalten werden kann, die korrekte Lokalisierung der Transkripte jedoch weiterhin von lokalen Signalen abhängig ist.

Der Einfluß von Signalmolekülen der BMP-Familie auf die Ohrentwicklung wurde durch lokale Überexpression von BMP2 bzw. des BMP-Antagonisten Noggin untersucht. Eine ektopische BMP-Quelle in Nachbarschaft zur Ohrplakode führte zur transienten Ausbildung zusätzlicher epithelialer Strukturen, während die Innenohrmorphogenese durch Applikation von Noggin im Vesikelstadium arretiert wurde. Diesen morphologischen Effekten gingen Veränderungen in der Aktivität von Nkx5-1 und Dlx5, nicht aber von Pax2 voraus. BMP induzierte morphologische und molekulare Veränderungen weisen darauf hin, daß BMPs in der Ohrentwicklung nicht nur bei der Spezifizierung der Sinnesepithelien sondern auch in der Morphogenese vestibulärer Innenohrkompartimente eine wichtige Rolle spielen.

1. Einleitung

1.1 Bau und Funktion des Innenohrs

Das Innenohr der Vertebraten ist ein äußerst komplex aufgebautes primäres Sinnesorgan. Als ein Organ von zunächst sehr einfacher und schließlich hoch komplizierter dreidimensionaler Struktur erlaubt es, eine Vielzahl entwicklungsbiologischer Fragestellungen zu untersuchen: Induktion und Spezifikation, Regionalisierung, Neurogenese, epithelial-mesenchymale Interaktion und Transition, Signalübertragung und Morphogenese. Das Innenohr stellt somit ein äußerst interessantes Modellsystem für das Studium entwicklungsbiologischer Prinzipien in Vertebraten dar, und ein Verständnis der Innenohrentwicklung erlaubt Rückschlüsse auf verwandte Prozesse im Embryo.

Das reife Innenohr hat zwei Funktionen: Es beherbergt das Hörorgan zur Wahrnehmung von Schallwellen sowie die Organe des Gleichgewichtssinns. Das Ohr gliedert sich in drei Teile, das Äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Äußeres Ohr und Mittelohr dienen lediglich der Schallweiterleitung, während das Innenohr das eigentliche Organ der Sinneswahrnehmung darstellt und, wie Abbildung 1 zeigt, eng in das Felsenbein eingebettet ist.

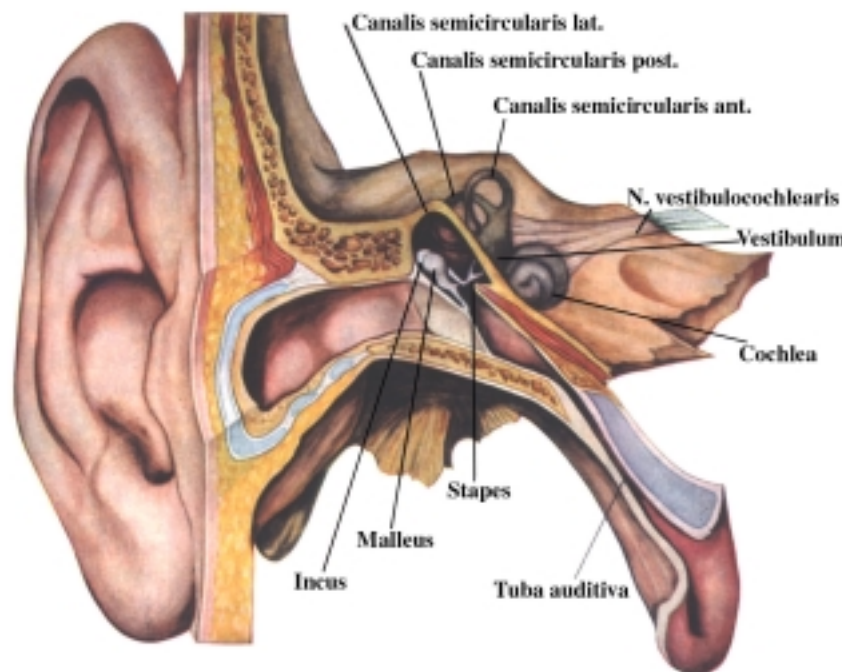


Abbildung 1: Überblick über die Bestandteile des menschlichen Ohrs: Äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr. Das Außenohr wird durch das Trommelfell von der luftgefüllten Paukenhöhle des Mittelohrs abgegrenzt. Diese ist über die Ohrtrompete (*Tuba auditiva*) mit dem Rachenraum verbunden und wird von den drei Gehörknöchelchen, Hammer (*Malleus*), Amboß (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*) durchspannt. Das mit Perilymphe gefüllte Labyrinth des Innenohrs wird aus zwei Teilen gebildet: Dem Vestibulum, das die Sinnesorgane des Gleichgewichts beherbergt, sowie der Cochlea, dem Sitz des Hörorgans. Über afferente Fasern des *Nervus vestibulocochlearis* werden Sinnesreize in die Hörrinde des Gehirns weitergeleitet. Abkürzungen: ant.: anterior; lat.: lateral; post.: posterior; N.: Nervus.

Der Feinbau des Innenohrs ist in Abbildung 2 dargestellt. Es besteht aus einem knöchernen und einem epithelialen Anteil. Das knöcherne Labyrinth bildet um das epitheliale Labyrinth herum eine geschlossene Kapsel. Das mit Endolymphe gefüllte membranöse Labyrinth mit seinen zur Aufnahme der Sinnesreize spezialisierten Epithelien liegt dieser Knochenkapsel jedoch nicht direkt an, sondern wird durch einen Perilymphraum von ihr getrennt.

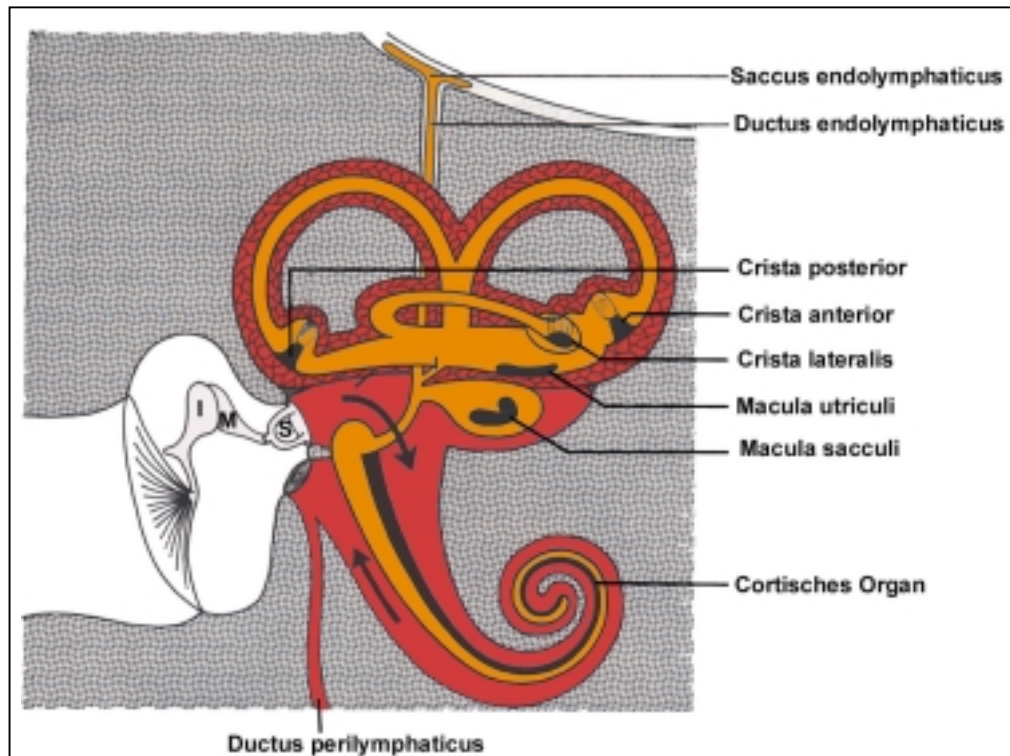


Abbildung 2: Schema der feineren Gliederung von Mittelohr und Innenohr des Menschen. Perilymphräume sind rot und Endolymphräume orange dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Sinnesendstellen des Gleichgewichtssinns (*Cristae* und *Maculae*) und des Hörsinns (Cortisches Organ). Abkürzungen: I: *Incus*; M: *Malleus*; S: *Stapes*.

Das Gleichgewichtsorgan besteht aus dem Utriculus und dem Sacculus, die in einer gemeinsamen Knochenhöhle (*Vestibulum*) gelegen sind, sowie den drei in den Utriculus mündenden Bogengängen, von denen jeder in einen eigenen Knochenkanal eingeschlossen ist. Die Sinnesepithelien von Utriculus (*Macula utriculi*), Sacculus (*Macula sacculi*) und den drei Bogengängen (*Cristae ampullaris*) bilden verschiedene Aspekte des Gleichgewichtssinns aus: Die *Maculae* detektieren Gravitation und Linearbeschleunigung und bilden so den Lagesinn aus, während die *Cristae* Winkelbeschleunigung wahrnehmen und damit den Drehsinn ausbilden. Das Hörorgan liegt in der knöchernen Schnecke (Cochlea) und wird von den Sinnesepithelien des Cortischen Organs gebildet, das sich entlang der gesamten Länge des cochleären Gangs zieht.

In Vestibularorgan und Hörorgan dient der gleiche mechanosensitive Zelltyp, die Haarzelle, als primäre Rezeptorzelle. Durch Veränderungen der Lage im Raum wird die Endolymphe in Bewegung gesetzt und erzeugt damit einen Reiz für die Haarzellen in den Sinnesepithelien des vestibulären Systems. Vom Außenohr empfangene, durch das Mittelohr weitergeleitete und verstärkte Schallwellen werden im cochleären Gang in Endolymphschwingungen umgesetzt, die den Hörreiz in den Haarzellen des Cortischen Organs erzeugen. Die den Haarzellen anliegenden Synapsen wandeln den mechanischen Reiz in ein elektrochemisches Potential um, das über die afferenten Fasern des VIII. (vestibulocochleären) Ganglions ins zentrale Nervensystem weitergeleitet wird.

1.2 Das Innenohr entwickelt sich aus einer ektodermalen Plakode.

Die drei Abschnitte des Vertebratenohrs leiten sich entwicklungsgeschichtlich von höchst unterschiedlichen Strukturen ab. Das Äußere Ohr, das Mittelohr und das knöcherne Labyrinth sind Derivate des Kopfmesoderms. Dagegen haben die membranösen Anteile des vestibulären und des auditiven Systems sowie das sie innervierende vestibulocochleäre Ganglion einen neuroektodermalen Ursprung: Sie entwickeln sich aus der otischen Plakode, einer Verdickung lateral der Rhombomere fünf und sechs des embryonalen Hinterhirns. Eine Übersicht über die Innenohrentwicklung, die vor allem verschiedene Aspekte der frühen Entwicklungsphase herausstellt, wird in Abbildung 3 gegeben. Die gezeigten Schemata stellen idealisierte Vertebratenembryonen dar. Um einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Modellsystemen, insbesondere Maus und Huhn, zu ermöglichen, werden die Stadien der Innenohrentwicklung mit dem Fortschreiten der Somitogenese korreliert.

Die Ohrplakode wird schon im 5-8 Somitenstadium angelegt. Sie besteht aus einem einschichtigen, kolumnaren Epithel, das durch die gleichzeitige Ausdünnung des umliegenden Oberflächenektoderms im 8 Somitenstadium deutlich sichtbar aus diesem hervortritt (Abb. 3 B). Im Folgenden invaginiert die Ohrplakode in das darunterliegende Mesenchym, wodurch die Ohrgrube entsteht. Schon zu diesem Zeitpunkt lösen sich, wie Abbildung 3 C zeigt, Neuroblasten aus dem medialen Abschnitt des Ohrepithels und wandern in das darunterliegende Mesenchym ein. Später schließen sich diese Zellen zusammen und bilden das VIII. (vestibulocochleäre) Ganglion aus. Die Ränder der Ohrgrube nähern sich im Weiteren immer mehr aneinander an und verschmelzen schließlich. Im 28-30 Somitenstadium ist so das sphärische, mit Endolymphe gefüllte Ohrvesikel entstanden, das nun vollständig vom Oberflächenektoderm abgeschnürt ist und die Anlage des häutigen Labyrinths bildet (Abb. 3 D).

Eingeleitet von einer Phase massiver Zellproliferation und einer Ausdehnung des Vesikelepithels in dorsoventrale Richtung beginnt im Folgenden die Morphogenese der verschiedenen anatomischen Kompartimente.

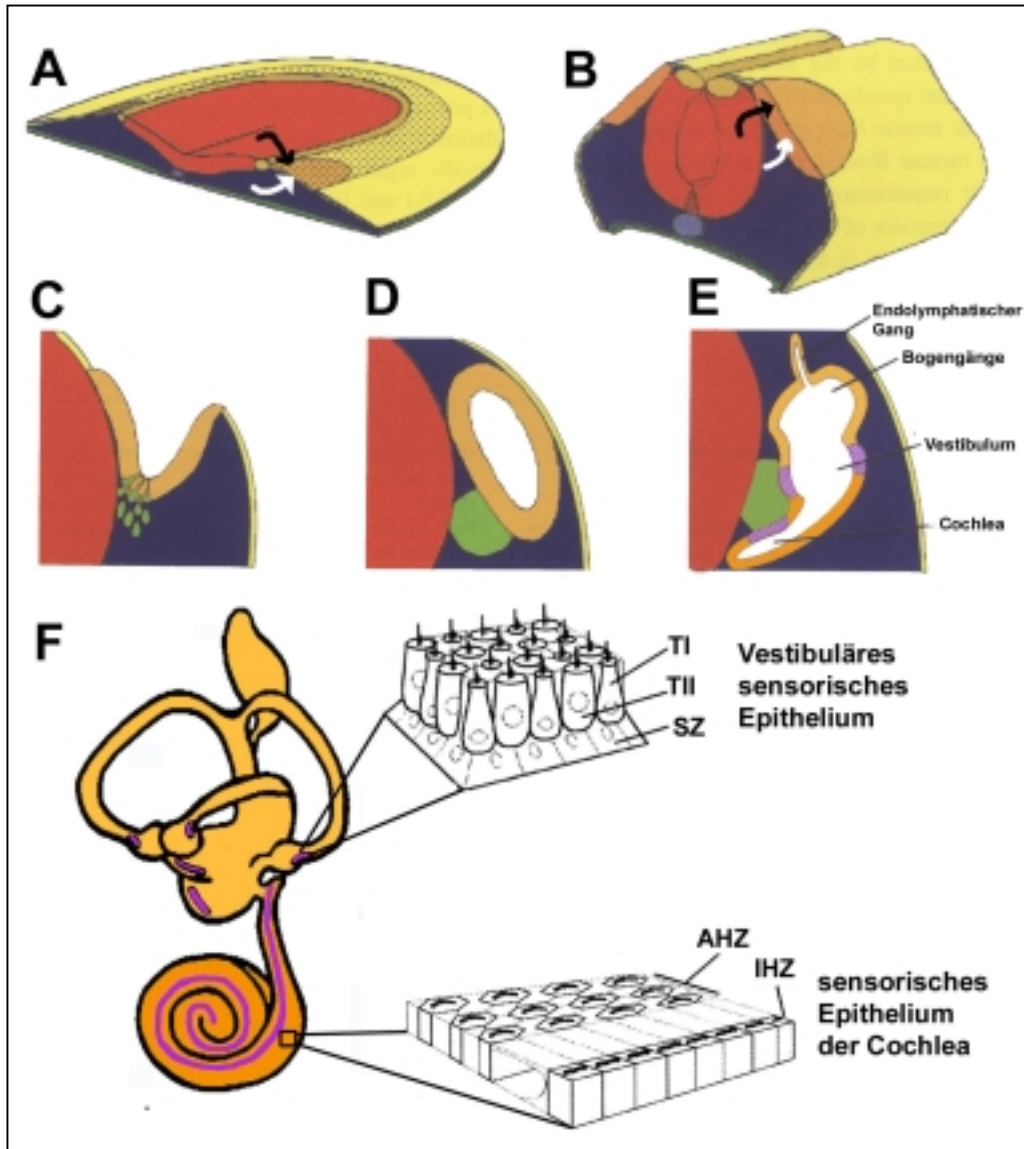


Abbildung 3: Übersicht über die frühen Phasen der Innenohrentwicklung eines idealisierten Vertebraten. A zeigt eine dreidimensionale Ansicht eines Embryos im Kopffaltenstadium. Dieser wurde in der prospektiven Ohrregion durchgeschnitten, um die Lage der embryonalen Gewebe zueinander und die Herkunft induzierender und regulierender Signale zu verdeutlichen. Die prospektive Ohrplakode ist in orange und der Streifen prospektiven Kopfplakodenektoderms gelb schraffiert dargestellt. Mögliche Quellen Plakoden-induzierender oder -spezifizierender Signale sind in erster Linie das unterhalb der Ohrplakode liegende Mesenchym (violett, weißer Pfeil) sowie das benachbarte Neuroektoderm (rot, schwarzer Pfeil). B zeigt eine ähnliche Ansicht eines Embryos im Ohrplakodenstadium. Signale zur Determinierung und Regionalisierung der Plakode entstammen vor allem dem Neuroepithelium des Hinterhirns (schwarzer Pfeil) und nur noch in geringerem Maße dem Mesenchym (weißer Pfeil). C, D und E repräsentieren transversale Schnitte durch otische Strukturen. (C) Ohrgrube, Neuroblasten (grün) delaminieren aus dem Ohrephithelium. (D) Ohrvesikel, Formierung des vestibulocochleären Ganglions ventromedial des Vesikels. (E) Differenzierung des

Ohrvesikels. Die Primordien der verschiedenen anatomischen Regionen sind indiziert und prospektive Sinnesepithelien violett schraffiert dargestellt. F zeigt schematisch den Aufbau des reifen Innenohrs. Vestibuläre Strukturen (gelb) sind von cochleären Strukturen (orange) farblich abgesetzt. Sinnesorgane sind violett dargestellt. Skizzen zeigen schematische Vergrößerungen der vestibulären und auditiven sensorischen Epithelien. In vestibulären Sinnesfeldern sind TypI und TypII Haarzellen (TI bzw. TII) zwischen den Stützzellen (SZ) verteilt. Im Cortischen Organ sind äußere Haarzellen (AHZ) in drei und innere Haarzellen (IHZ) in einer einzigen Reihe angeordnet, die sich jeweils entlang der gesamten Längsachse der Cochlea erstrecken.

Dabei gehen die vestibulären Kompartimente des häutigen Labyrinths aus dem dorsolateralen Abschnitt und auditive Strukturen aus dem ventromedialen Teil des Ohrvesikels hervor (Li et al., 1978). Dieser Prozeß wird von der Differenzierung der verschiedenen spezialisierten Zelltypen des häutigen Labyrinths und der vom Ohrvesikel induzierten Verknöcherung des periotischen Mesenchyms, die zur Ausbildung der knöchernen Labyrinthkapsel führt, überlagert. Zunächst entsteht an der dorsomedialen Vesikelwand eine Ausstülpung nach dorsal, aus welcher der endolymphatische Gang hervorgeht. Die Anlagen der drei Bogengänge werden kurz darauf als zwei taschenförmige Ausstülpungen an der dorsolateralen Seite des Vesikels sichtbar. Mit einer ventralen Ausstülpung des Vesikelepithels beginnt bald danach die Entwicklung des cochleären Gangs. Etwa gleichzeitig wird der zentrale Hohlraum des Vesikels von lateral her immer weiter verengt, so daß die Anlagen von Utriculus und Sacculus räumlich voneinander getrennt werden (Abb. 3 E). Komplexe, zeitlich eng verflochtene Prozesse von Proliferation, Morphogenese, Zelldifferenzierung und Neurogenese, die erst postnatal abgeschlossen sind, führen im Weiteren zur Ausbildung des reifen häutigen Labyrinths (Abb. 3 F).

1.3 Gewebeinteraktionen und Genaktivitäten induzieren die Ohrplakode und steuern frühe Musterbildungsprozesse.

1.3.1 Mesendodermale Signale induzieren die Ohrplakode.

Obgleich über Anatomie, Neurophysiologie und Morphogenese des Innenohrs umfangreiche Studien vorliegen und erste Experimente zur Induktion der Innenohrplakode bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts durchgeführt wurden, sind die Mechanismen zur Steuerung der Innenohrentwicklung auf molekularer Ebene erst in Ansätzen verstanden.

In den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts untersuchte Yntema Induktion und Determination des Ohrfelds durch Transplantationsexperimente an *Amblyostoma*-Embryonen. In diesen Experimenten verfolgte er einerseits die Entwicklung von Nicht-Ohr-Ektoderm nach Transplantation in die prospektive Ohrregion und zum anderen die Entwicklung von prospektivem Ohrektoderm außerhalb der Ohrregion. So konnte er zeigen, daß die Fähigkeit von fremdem Ektoderm, sich zum

Innenohr zu entwickeln, von seiner ursprünglichen Position im Spenderembryo abhängig ist. Ektodermtransplantate aus der Nähe der prospektiven Ohrregion konnten eher zu Ohrektoderm transformiert werden als Transplantate aus weiter entfernten Regionen des Embryos. Zudem gaben seine Experimente einen Hinweis darauf, daß das Ohrektoderm erst zum Zeitpunkt des Neuralrohrschlusses vollständig determiniert ist (Yntema, 1933). Ähnliche Fragestellungen wurden auch in Hühnchenembryonen adressiert (Waddington, 1937). Beide Autoren, Waddington und Yntema, schlugen vor, daß die Spezifizierung des Ohrektoderms durch induktive Signale aus dem unterliegenden Mesoderm und dem benachbarten Neuroektoderm erfolgen sollte.

Durch eine exaktere zeitliche Eingrenzung der Operationen mit dem Ziel, induktive Aktivitäten und Kompetenzverhältnisse weiter aufzuschlüsseln, konnte Yntema schließlich eine frühe Induktion durch das Mesoderm, die mit einer späteren Phase der Induktion durch Neuroektoderm überlappt, postulieren (Yntema, 1950). Parallel hierzu zeigt das Ektoderm zwei Kompetenzperioden, um auf die aktivierenden Signale zu antworten. Ein solches Konzept sukzessiver Schritte zur Ohrbildung, das bereits 1945 vorgeschlagen wurde (Harrison, 1945), bildet die Basis für das heutige Verständnis der frühen Ohrentwicklung. Einige Jahre später wurde die Idee eines gemeinsamen Plans für die Entwicklung der verschiedenen ektodermalen Kopfplakoden formuliert (Jacobsen, 1963 und 1966). Jacobsen führte dazu Transplantationsexperimente an Amphibienembryonen durch, bei denen er einen Ektodermstreifen, aus dem sich Nasen- Linsen- und Innenohrplakode entwickeln, bezüglich der anterior-posterioren Achse rotierte. Wurde diese Operation im Gastrulastadium durchgeführt, entwickelten sich die verschiedenen Sinnesorgane in der normalen Lage relativ zur Längsachse des Embryos. Das transplantierte prospektive Plakodengewebe muß daher zu diesem frühen Stadium noch eine breitere Kompetenz besitzen, sich in einer geeigneten Umgebung in ein beliebiges der drei Sinnesorgane zu entwickeln. Dahingegen führten entsprechende Rotationsexperimente an Embryonen im späten Neurulastadium dazu, daß sich alle drei Sinnesorgane in den ektopischen Positionen gemäß ihrer Herkunft entwickelten. Das zeigt, daß die verschiedenen Plakoden zu diesem Zeitpunkt schon auf ihr jeweiliges Entwicklungsprogramm festgelegt sind und nicht mehr durch eine veränderte Umgebung umprogrammiert werden können.

Der genaue zeitliche Ablauf für die Spezifizierung des Ohrfelds innerhalb des Oberflächenektoderms wurde in *Xenopus*-Embryonen untersucht, indem markiertes Ektoderm zu verschiedenen Entwicklungsstadien in die Ohrregion von Wirtsembryonen transplantiert wurde (Gallagher, 1996). Gallaghers Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Spezifizierung des Ohrfelds, zumindest in *Xenopus*-Embryonen, bereits im späten Gastrulastadium abgeschlossen ist, da dann Ektoderm aus der Umgebung des Ohrfelds das Potential verliert, sich zu Innenohrstrukturen zu entwickeln.

Als molekulare Bestätigung für Harrisons Hypothese eines zunächst allgemeinen Plakodenstatus für alle drei Sinnesorgane (Nase, Linse und Innenohr), aus dem erst später die Identitäten der einzelnen Plakoden festgelegt werden, sollte man fordern, daß dieser Prozeß durch ein

entsprechendes Muster von Genaktivitäten plakodenspezifischer Markergene widerspiegelt wird. Ein gemeinsamer prospektiver Plakodenstreifen für Nase, Linse und Innenohr sollte demnach mit einer gleichförmigen Expression verschiedener Gene im gesamten Streifen einhergehen. Mit der Determinierung der individuellen Plakodenidentitäten sollte die Expression dieser Gene dann soweit eingeschränkt werden, daß jede Plakode durch eine spezifische Kombination von Genaktivitäten charakterisiert wird. Interessanterweise zeigt ein Mitglied der *Distal-less*-Familie von Homöobox-Transkriptionsfaktoren, das *dlx3*-Gen des Zebrafischs, einen entsprechenden Expressionsverlauf: Im frühen Neurulastadium, für das ein noch allgemeiner Plakodenstatus postuliert wird, wird *dlx3* in einem kontinuierlichen Ektodermstreifen aktiviert. Später, wenn die Identitäten der individuellen Plakoden festgelegt werden, wird die Expression im gesamten Streifen herunterreguliert und nur in den prospektiven Ohr- und Nasenplakoden aufrecht erhalten (Egger, 1992). Die Tatsache, daß bis heute weder in der Maus noch im Fisch Mutationen identifiziert wurden, in denen der Ausfall eines einzelnen Gens zum vollständigen Verlust einer Sinnesplakode führt, spricht zudem dafür, daß die verschiedenen Plakoden eher durch kombinatorische Expression verschiedener Gene als durch die Aktivität eines einzelnen Gens spezifiziert werden. So kann der Verlust eines Gens zumindest teilweise kompensiert werden.

Ein Versuch, die Grundprozesse der frühen Ohrentwicklung, ihre zeitliche Abfolge und mögliche Quellen induktiver Signale schematisch darzustellen, ist in Abbildung 4 gezeigt.

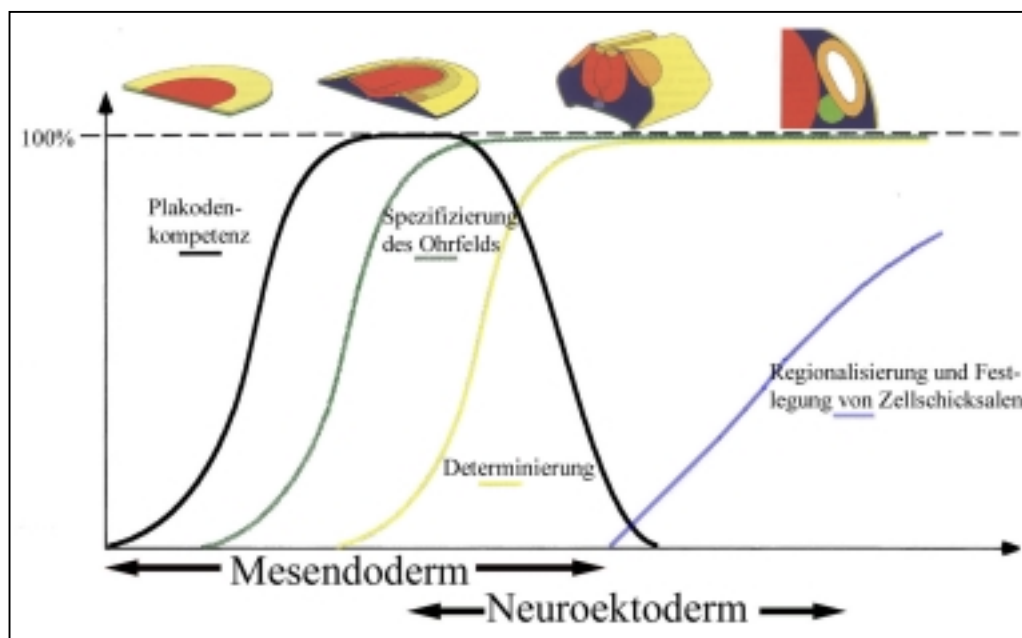


Abbildung 4: Grundprozesse der frühen Innenohrentwicklung. Die verschiedenen Kurven zeigen, wie weit die jeweiligen Prozesse abgelaufen sind. Die Schemata darüber geben einen ungefähren Bezug zwischen den von den Kurven repräsentierten Prozessen und den Entwicklungsstadien, wie sie in Abbildung 3 definiert wurden. Das Pfeildiagramm unterhalb der Kurve gibt die Zeitperioden an, in denen Derivate der beiden Keimschichten, Mesendoderm und Neuroektoderm, vermutlich einen wesentlichen Einfluß auf die Ohrentwicklung ausüben. Verändert übernommen aus Torres et al., 1998.

Wie oben beschrieben wird die Innenohrentwicklung bereits während der Gastrulation mit der Ausbildung einer allgemeinen Plakodenkompetenz durch einen Ektodermstreifen, der den anterioren Abschnitt der Neuralplatte umgibt, eingeleitet. Durch die Spezifizierung des Ohrfelds wird die Plakodenkompetenz dann auf die prospektive Ohrregion beschränkt. Für die Initiierung und Regulierung beider Phasen sind vertikale Signale aus dem unterliegenden Mesendoderm von entscheidender Bedeutung. Steuernde Einflüsse aus dem benachbarten Hinterhirn-Neuroektoderm spielen dagegen erst für die endgültige Determinierung des Ohrepitheliums sowie für nachfolgende Regionalisierungs- und Differenzierungsprozesse eine vorrangige Rolle.

Eine solche zeitliche Abfolge der induktiven Ereignisse wird auch durch die Ergebnisse einer genetischen Analyse der Gewebeinteraktionen, die für die Induktion der Ohrplakode im Zebrafisch erforderlich sind, nahegelegt. In dieser Studie wurden Zebrafischmutanten untersucht, in denen die Entwicklung putativer ohrinduzierender Gewebe gestört ist. Dabei konnte gezeigt werden, daß in Mutanten des prächordalen Mesoderms die Induktion der Ohrplakode erheblich verspätet erfolgte und zu einem morphologisch abnormalen Ohrvesikel führte. In Hinterhirnmutanten konnten dagegen keine Unregelmäßigkeiten in der Ausbildung der Ohrplakode sondern lediglich in den nachfolgenden Musterbildungsprozessen beobachtet werden. Mutanten mit Defekten im Chordamesoderm zeigten keine Störungen in der Ohrentwicklung (Mendonsa et al., 1999).

1.3.2 Der Einfluß des Hinterhirns auf die Ohrentwicklung

Während für die Induktion der Innenohrplakode Wechselwirkungen des Ektoderms mit dem darunterliegenden Mesendoderm von vorrangiger Bedeutung zu sein scheinen, spielen für die Invagination des Plakodenepithels und die Ausbildung und weitere Morphogenese des Ohrvesikels Signale aus dem benachbarten Hinterhirn eine übergeordnete Rolle. Der Einfluß des Hinterhirns auf diese Prozesse wurde im Wesentlichen durch drei Arten von Experimenten demonstriert:

- Die Analyse von Mausmutanten mit grob mißgebildetem Hinterhirn, die aufgrund ihrer Innenohrdefekte, wie Taubheit und/oder Fehlbildungen des vestibulären Systems identifiziert wurden.
- Gezielte Inaktivierung von im Hinterhirn exprimierten Genen in der Maus, deren Ausfall sekundär in Veränderungen der Innenohrmorphogenese resultiert.
- *In vitro*-Kokultivierungsstudien von Ohrektoderm in An- und Abwesenheit des benachbarten Hinterhirn-Neuroektoderms.

In vitro-Experimente an explantierten jungen Ohrepithelien zeigten, daß die Ausbildung des Ohrvesikels nur in Gegenwart von Neuroepithel aus dem Hinterhirn erfolgen kann (Noden et al., 1986; Represa et al., 1991). Daß für diese Interaktionen kein Zell-Zell-Kontakt erforderlich ist,

wurde durch Transfilter-Experimente belegt (Van De Water et al., 1982). Aus den Daten dieser Explantationsstudien muß man folgern, daß diffusible Moleküle aus dem Hinterhirn die instruktiven Signale für die Ausbildung des Ohrvesikels bilden.

Als Kandidaten kommen hierfür vor allem Mitglieder der FGF (Fibroblast Growth Factor)-Familie von Wachstumsfaktoren, in erster Linie das Proto-Onkogen FGF3/int-2, in Betracht. FGF3 wird in allen bis heute untersuchten Spezies während der Ausbildung und Einstülpung der Ohrplakode im benachbarten Hinterhirn und etwas später transient auch im Ohrepithel selbst exprimiert (Peters et al., 1983; Dickson et al., 1987; Wilkinson et al., 1988; Mahammod et al., 1995; Tannahill et al., 1992). Represa und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Invaginierung der Ohrplakode *in vitro* durch Zugabe von anti-FGF3-Oligonukleotiden oder FGF3-Antikörper verhindert wird (Represa et al., 1991). In FGF3-defizienten Mäusen wird das Ohrvesikel hingegen normal ausgebildet. Störungen in der Entwicklung des endolymphatischen Gangs führen dann jedoch zur Arretierung der Innenohrmorphogenese im späten Vesikelstadium (Mansour et al., 1993).

Genetische Analysen an Maus- und Zebrafischmutanten geben weiteren Einblick in die Funktion des Hinterhirns in der frühen Innenohrentwicklung. Diese Maus- oder Fischmutanten weisen primäre Defekte in der Entwicklung des Hinterhirn-Neuroektoderms auf, mit denen sekundäre Störungen in der Innenohrmorphogenese assoziiert sind (Fekete et al., 1999; Malicki et al., 1996; Whitfield et al., 1996). So sind beispielsweise in den klassischen Mausmutanten *kreisler*, *dreher* und *spotch* Innenohrdefekte an Mißbildungen des Hinterhirns gekoppelt. *Spotch*-Mäuse, bei denen die Stärke der Neuralrohranomalien variiert, haben nur dann Innenohrdefekte, wenn auch das Hinterhirn mißgebildet ist (Russell, 1947; Deol, 1966). Sehr viel später konnte gezeigt werden, daß der *Spotch*-Phänotyp aus einer Mutation in der Homöodomäne des Transkriptionsfaktors Pax3 resultiert, der in dorsalen Abschnitten des Neuralrohrs und in migrierenden Neuralleistenzellen, nicht aber im Innenohr exprimiert wird (Goulding et al., 1991; Epstein et al., 1991). *Kreisler*, eine weitere Mausmutante mit Innenohrdefekten, wurde 1944 in einem Röntgenmutagenese-Screening identifiziert und ist durch Gleichgewichtsstörungen und daraus resultierendes „Kreisel“ sowie Taubheit gekennzeichnet (Hertwig, 1944). In mutanten *kreisler*-Embryonen ist das Ohrvesikel mißgebildet und zu weit vom Hinterhirn entfernt (Deol, 1964). Eine molekulare Analyse der Hinterhirnentwicklung in *kreisler*-Mutanten hat Veränderungen in der Aktivität von solchen Genen aufgezeigt, die Musterbildungsprozesse im Hinterhirn steuern. Diese Veränderungen resultieren schließlich im Verlust der Rhombomere 5 und 6 (Frohman et al., 1993; McKay et al., 1994). Durch Positionsklonierung wurde schließlich das *kreisler*-Gen als ein Transkriptionsfaktor der „basic-domain-leucine-zipper“-Familie identifiziert (Cordes et al., 1994). Das *kreisler*-Gen wird vom 5 Somitenstadium bis zur vollständigen Abschnürung des Ohrvesikels in den Rhombomeren 5 und 6, die direkt an die Ohranlage angrenzen, aber nicht im Innenohrepithel selbst exprimiert. Ein weiteres Beispiel für ein Gen, das über seine Aktivität im Hinterhirn erheblichen Einfluß auf die Innenohrentwicklung nimmt, ist das Homöoboxgen Hoxa-1, das anterior-posteriore Identitäten im

Hinterhirn bestimmt. Die gezielte Inaktivierung von *Hoxa-1* resultiert in einem ähnlichen Phänotyp wie die *kreisler*-Mutation: einem cystischen und verkleinerten, rostral-lateral verlagerten Ohrvesikel. Interessanterweise ist sowohl in *Hoxa-1*- als auch in *kreisler*-Mutanten die Expression des Signalmoleküls FGF3 stark reduziert (Mark et al., 1993).

1.3.3 Spezifizierung von Regionen und Zellschicksalen

Derivate der Ohrplakode zeigen eine Vielzahl zellulärer Phänotypen, deren Entstehung eine Kaskade von Zellschicksalsentscheidungen nötig macht. Die unterschiedlichen Zelltypen im häutigen Labyrinth sind wiederum in verschiedenen Organen und spezialisierten Epithelien organisiert. Die Morphogenese einer derart komplexen Struktur erfordert neben der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen auch die Festlegung eines übergeordneten Bauplans, der die Identitäten einzelner Regionen definiert.

Ein grundlegender Schritt bei der Festlegung eines solchen, übergeordneten Bauplans sollte in der Definierung der drei Achsen, anterior-posterior, dorsal-ventral und medial-lateral, innerhalb des frühen Ohrepitheliums bestehen. Im Labor von Doris Wu wurden Experimente durchgeführt, bei denen Ohrvesikel im Hühnchen zu verschiedenen Entwicklungsstadien bezüglich der drei Achsen um 180 Grad rotiert und die Architektur der daraus resultierenden Innenohren nach mehrtägiger Inkubation analysiert wurde (Wu et al., 1998). Diese Studien zeigten, daß die verschiedenen Achsen nicht gleichzeitig sondern nacheinander, in der Reihenfolge anterior-posterior, dorsal-ventral und zuletzt medial-lateral festgelegt werden. Die Achsen der Sinnesepithelien werden zudem eher als und unabhängig von den sie umgebenden nichtsensorischen Epithelien festgelegt. Geht man davon aus, daß die Spezifizierung der Achsen auf einer asymmetrischen Expression von Genen beruht, könnte man aufgrund der Vielzahl von in der Literatur beschriebenen, schon im Ohrgrubenstadium eng regionalisierten Genexpressionsmustern erwarten, daß die verschiedenen Achsen des Ohrepitheliums bereits in diesem Stadium angelegt sein sollten. Die oben beschriebenen Experimente zeigten jedoch, daß eine endgültige Festlegung der Achsen erst im frühen Ohrvesikelstadium (H.H.-Stadium 16-18) mit der anterior-posterioren Achse der Sinnesepithelien beginnt.

Der erste Zelldifferenzierungsprozeß in der Innenohrmorphogenese, die Auswanderung neuronaler Vorläuferzellen von der ventromedialen Seite des Epitheliums, beginnt bereits im späten Ohrgrubenstadium. Neuronale Marker wie β -Tubulin werden schon kurz vorher von einzelnen Zellen innerhalb des Ohrepithels exprimiert, was darauf hinweist, daß Neuroblasten-Vorläufer spezifiziert werden, bevor sie aus dem Epithelverband delaminieren (Vogel et al., 1993).

Im Anschluß an die Formierung des sphärischen Ohrvesikels finden umfangreiche morphogenetische Prozesse statt, durch die die endgültige Architektur des häutigen Labyrinths

bestimmt wird. Zeitgleich damit werden im Ohrepithel die Areale der sensorischen Epithelien ausgebildet. Das Entstehungsmuster der zukünftigen sensorischen Organe kann schon lange vor der Ausprägung ihrer charakteristischen Morphologie anhand der Expression einer Kombination von Markergenen sichtbar gemacht werden. Dabei markiert BMP4, ein Signalmolekül der TGF- β Familie, alle zukünftigen sensorischen Regionen und der „low-affinity“ NGF-Rezeptor p75 die Anlagen der drei Cristae. Das Homöoboxgen *Msx-1* wird in den drei Cristae und in den Anlagen von Macula neglecta und Lagna, zwei für das Innenohr des Vogels charakteristischen Sinnesepithelien, exprimiert (Wu et al., 1996).

Zwei Transkriptionsfaktoren, die an Regionalisierungsprozessen und der Morphogenese verschiedener Innenohrstrukturen beteiligt sind, sind das Homöobox-Gen *Nkx5-1/Hmx3* und das „paired-box“-Gen *Pax2* (Bober et al., 1994; Nornes et al., 1990; Rinkwitz-Brandt et al., 1995 und 1996). Die gezielte Inaktivierung des *Nkx5-1/Hmx3*-Gens führt zu Mißbildungen im vestibulären System mit dem Fehlen oder einer nur rudimentären Anlage eines oder mehrerer Bogengänge. Infolgedessen ist der Gleichgewichtssinn der mutanten Mäuse gestört und sie laufen im Kreis (Hadrys et al., 1998; Wang et al., 1998). Dahingegen resultiert der Verlust des *Pax2*-Gens in tauben Mäusen, denen die Cochlea sowie ventrale Teile des Sacculus fehlen (Torres et al., 1996). *Nkx5-1* und *Pax2* werden vom Ohrgrubenstadium an, über das Ohrvesikelstadium hinaus, in einem zueinander komplementären Muster exprimiert. Die verschiedenen Regionen, die anatomischen oder funktionellen Kompartimenten des adulten Organs entsprechen, scheinen daher bereits in frühen Stadien angelegt zu werden. Molekulare Analysen zeigten, daß weder die Aktivität des *Pax2*-Gens in *Nkx5-1*-Mutanten noch umgekehrt die des *Nkx5-1*-Gens in *Pax2*-Mutanten verändert ist (Hadrys et al., 1998). Dieser Befund gibt einen Hinweis darauf, daß Spezifizierung und Differenzierung der verschiedenen anatomischen Kompartimente unabhängig voneinander erfolgen und möglicherweise von unabhängigen externen Signalwegen gesteuert werden. Ähnlich wie die Ausschaltung des *Nkx5-1*-Gens führt auch die gezielte Inaktivierung des *netrin1*-Gens, das für ein sekretiertes, in Zellmigrationsprozesse involviertes Protein kodiert, zu massiven Störungen der Bogengangmorphogenese. *netrin1*-mutante Mäuse entwickeln nur Ansätze des anterioren Bogengangs, posteriorer und lateraler Gang werden nicht ausgebildet. Die Sinnesepithelien der Bogengänge, die Cristae, werden jedoch, wie auch in *Nkx5-1*-mutanten Mäusen, trotz Abwesenheit oder Fehlbildung der sie umschließenden Strukturen normal angelegt (Salminen et al., 2000). Beide Beispiele unterstützen die in Abbildung 5 skizzierte Vorstellung, daß eine Unterscheidung zwischen sensorischen und nichtsensorischen Epithelien vor der Festlegung der Identitäten der einzelnen Organe erfolgt und die Entwicklung der Sinnesepithelien im Weiteren nicht von der Morphogenese der Gesamtstruktur beeinflusst wird (Fekete et al., 1996).

Zellschicksalsstudien an Hühnchenembryonen haben gezeigt, daß einer der letzten Differenzierungsschritte bei der Ausbildung der Sinnesepithelien die Spezifizierung der

Haarzellidentität gegenüber der Stützzellidentität ist. Die Segregation beider Zellschicksale erfolgt möglicherweise erst bei der letzten Zellteilung des gemeinsamen Vorläufers (Fekete et al., 1998; Abb. 5). Eine Reihe von Arbeiten geben einen Hinweis darauf, daß der Entstehung des charakteristischen Mosaiks aus Haar- und Stützzellen in den sensorischen Epithelien des Vertebratenohrs, wie der Bildung der mechanosensitiven Borsten in der Fruchtfliege *Drosophila* die laterale Inhibition zu Grunde liegt. Dieser Mechanismus beruht auf dem koordinierten Zusammenspiel des Rezeptormoleküls Notch mit seinen Liganden, Mediatoren und Effektoren. Für eine Vielzahl von Komponenten dieser Signalkaskade, wie den Rezeptor Notch selbst, seine Liganden Delta, Serrate, Jagged1 und Jagged2, das proneurale Math1-Gen und die inhibitorischen Effektorgene Hes1 und Hes5 konnte inzwischen durch detaillierte Expressionsstudien und funktionelle Experimente in Maus, Ratte und Hühnchen eine Beteiligung an der Entwicklung der Feinstruktur der sensorischen Epithelien des Innenohrs aufgezeigt werden (Adam et al., 1996; Bermingham et al., 1999; Lanford et al., 1999; Shailam et al., 1999; Zine et al., 2000; Zheng et al., 2000a und 2000b; Eddison et al., 2000). Einer der wichtigsten Spieler bei der Kontrolle der Haarzelldifferenzierung scheint dabei der basische „helix-loop-helix“ (bHLH) Transkriptionsfaktor Math1, ein Säugetierortholog des *Drosophila* atonal-Gens, zu sein. Die gezielte Ausschaltung von Math1 in der Maus führt zu einer vollständigen Blockade der Haarzelldifferenzierung (Bermingham et al., 1999). Umgekehrt hat seine Überexpression in Cochlea-Explanten der Ratte die Ausbildung zusätzlicher Haarzellen zur Folge (Zheng et al., 2000a). Die Ausschaltung von Hes1, einem negativen Regulator der Neurogenese, der in den Stützzellen von Cochlea und Utriculus exprimiert wird, resultiert dagegen in der Ausbildung zusätzlicher Haarzellen in beiden Strukturen (Zheng et al., 2000b). Die Integration der einzelnen Daten führt zu einem Modell, demzufolge es in allen prospektiven Sinnesregionen des Innenohrs durch die Expression proneuraler Gene wie Math1 in gemeinsamen Vorläuferzellen, über die Aktivierung von Notch-Liganden in zukünftigen Haarzellen, zur Expression von Notch in den benachbarten Stützzellen kommt. In diesen wird der Stützzellphänotyp schließlich durch die Aktivität von negativen Regulatoren wie Hes1 aufrecht erhalten. Durch Variationen in der Expression der Notch-Liganden und Notch-Effektorgene wird dieser Prozeß in den verschiedenen sensorischen Epithelien dabei mit geringfügigen Unterschieden durchlaufen (Shailam et al., 1999).

Ein weiteres, in allen sensorischen Epithelien des Innenohrs für die Ausbildung reifer Haarzellen essentielles Molekül ist der Pou-Domänen-Transkriptionsfaktor Brn3-1/Brn-3c, der in allen postmitotischen prospektiven Haarzellen, aber nicht in deren mitotischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Der Verlust der Brn3-1-Aktivität resultiert im Verlust der Haarzellen in allen sensorischen Epithelien. Dabei werden die Haarzellen zwar zunächst gebildet und durchlaufen frühe Differenzierungsschritte, ihr Zusammenschluß zu funktionellen Bündeln von Stereozilien

unterbleibt jedoch und sie degenerieren durch Apoptose (Erkman et al., 1996; Xiang et al., 1997 und 1998).

Ein Schema, das die mögliche Abfolge der Entscheidungsschritte während der Innenohrmorphogenese illustriert, ist in Abbildung 5 dargestellt.

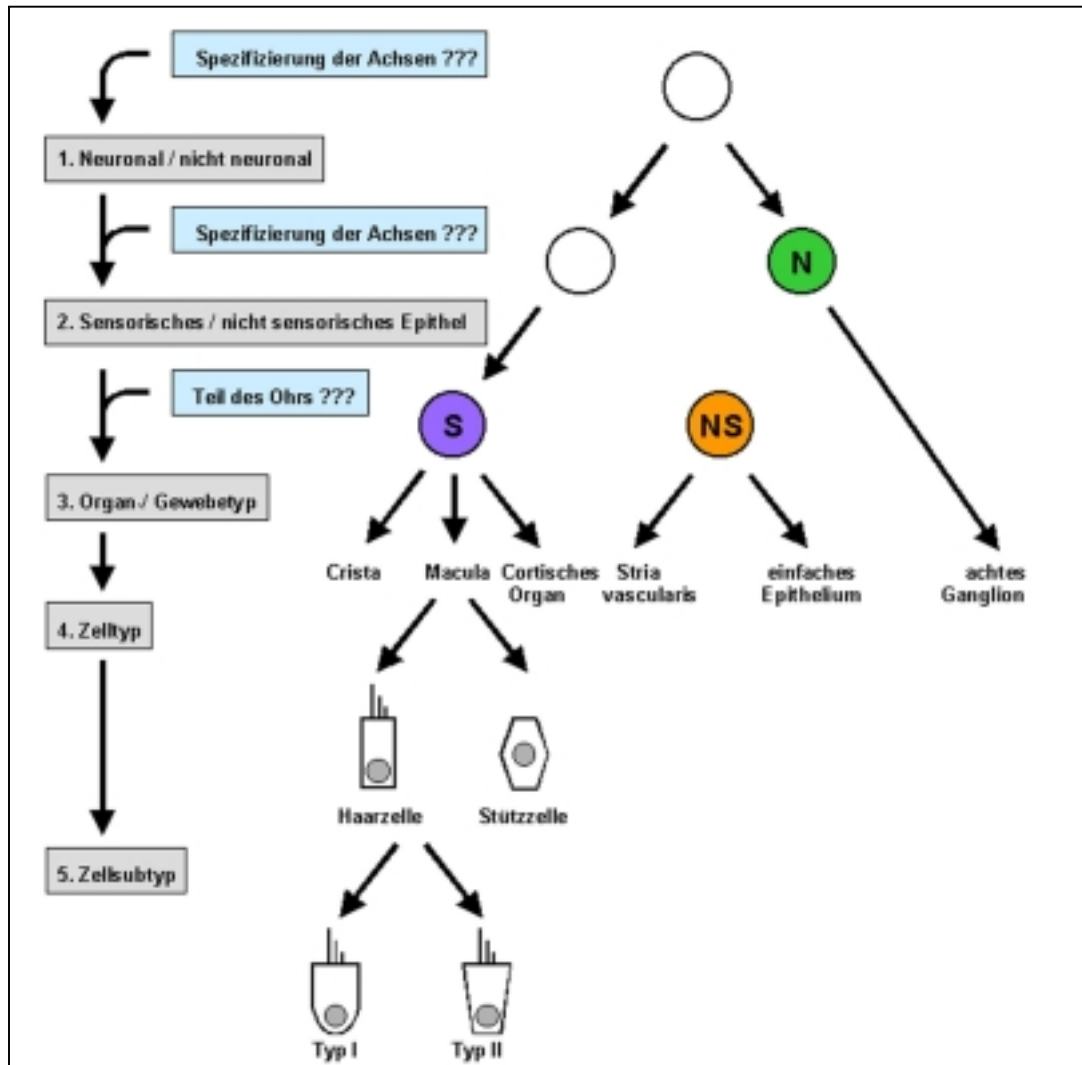


Abbildung 5: Mögliche Abfolge von sukzessiven Zellschicksalsentscheidungen, die zur Spezifizierung der verschiedenen Zelltypen des Innenohrs führen. Abkürzungen: N: neurogen; NS: nicht sensorisches Epithelium; S: Sinnesepithelium. Verändert übernommen aus Donna M. Fekete: Cell fate specification in the inner ear; Current Opinion in Neurobiology, 1996.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten Gewebeinteraktionen und Signalmoleküle, die frühe Musterbildungsprozesse im Innenohreithelium des Hühnchens steuern, analysiert werden. Einen Schwerpunkt der Arbeit sollte dabei die Untersuchung der Rolle des Hinterhirns in diesen Prozessen darstellen. Die technische Grundlage zur Adressierung dieser Fragestellung bildeten

Transplantationsexperimente an Hühnchenembryonen. Durch Transplantation von Ohrektoderm verschiedener Entwicklungsstadien an unterschiedliche ektopische Positionen entlang der Längsachse und in die Flügelknospen sollte zunächst der Einfluß des lokalen Umfelds der Plakode auf die Ohrmorphogenese analysiert werden. Die Implantation von Goldbarrieren zwischen Hinterhirn und Ohrplakode und die Transplantation von zusätzlichem Neuroepithelium lateral der Plakode sollten weiteren Aufschluß darüber geben, inwieweit die Regionalisierung des Ohrepitheliums von Wechselwirkungen mit dem Hinterhirn abhängt. Ergänzt werden sollten diese Experimente durch Explantationsstudien, bei denen frühes Innenohrepithelium allein oder in Gegenwart von Hinterhirn und Mesenchym *in vitro* kultiviert wird. Durch Implantation von Zellaggregaten, die das Signalmolekül BMP2 bzw. den BMP-Antagonisten Noggin exprimieren, sollte darüber hinaus die Frage adressiert werden, welche Funktion Signalmoleküle der BMP-Familie bei der Regulation der frühen Innenohrmorphogenese ausüben. Alle Manipulationen sollten nicht nur morphologisch sondern auch im Hinblick auf die Expression von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen, die an der Entwicklung unterschiedlicher Innenohrkompartimente beteiligt sind, analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen

Chemikalien :

In der Regel wurden p.a. Substanzen folgender Firmen verwendet: Amersham Buchler GmbH (Braunschweig), Bio-Rad Laboratories (München), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Gibco Life Science (Heidelberg), Merck AG (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Schwalbach), Promega Deutschland GmbH (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma Chemie (Deisenhofen), Stratagene GmbH (Heidelberg).

Enzyme:

Restriktionsendonukleasen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von New England Biolabs (Schwalbach), RNA-Polymerasen von Promega (Heidelberg), Dispase und DNaseI von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Gebrauchswaren:

Gebrauchswaren wurden in der Regel über den Zwischenhändler Wilke u. Witzel, der Produkte der meisten Firmen vertreibt, bezogen.

Einmalfilter Minisart NML (Porengrößen 0,20 und 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Objektträger und Deckgläschen	Schütt, Göttingen
Plastikwaren	Falcon GmbH, Düsseldorf Greiner GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Schütt, Göttingen
Goldfolie	Goodfellow, Cambridge, UK (Katalog-Nr. TA000280)
Kodak 64T-Diafilme	Bode, Hamburg

Befruchtete Hühnereier:

Befruchtete Hühnereier (*Gallus gallus*) wurden im ersten Abschnitt der Arbeit von der Fa. Lohmann (Cuxhafen), später von der Fa. Charles River (Extertal) bezogen.

2.2 Puffer und Stammlösungen

BSA	10 mg/ml in bidest. H ₂ O
6 x DNA-Ladepuffer	2,5% Ficoll in bidest. H ₂ O + Bromphenolblau + Xylencyanol
DTT	100 mM in 10mM NaAc pH5,2
Ethidiumbromid	10 mg/ml in bidest. H ₂ O
Glykogen	35 mg/ml in bidest. H ₂ O
IPTG	100 mM in bidest. H ₂ O
X-Gal	2% w/v in N, N-Dimethylformamid
Glutamin (ZK)	2 M Glutamin in bidest. H ₂ O
10 x Trypsin / EDTA (TE, ZK)	0,5% Trypsin, 0,2% EDTA in bidest. H ₂ O
Dispase-Lösung	1 mg/ml in HBSS mit DnaseI (500 U/ml)
Chick-Ringer-Lösung	7,2 g/l NaCl 0,17 g/l CaCl 0,37 g/l KCl auf pH7,2 einstellen
Chloropan:	0,5 Vol. mit TE pH8,0 gesättigtes Phenol 0,5 Vol. Chloroform 0,5% 8-Hydroxychinolin
10 x PBS	140 mM NaCl 13 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,0 – 7,4
4% PFA, pH7,2	4 g Paraformaldehyd in 90 ml H ₂ O unter dem Abzug auf 50°C erhitzen; einige Tropfen NaOH zugeben, bis Lösung klar wird. Lösung abkühlen und 10 ml 10 x PBS zugeben. pH mit HCl einstellen. Fertige Lösung filtrieren und in Aliquots bei –20°C lagern.
10 x TE	100 mM Tris pH8,0 10 mM EDTA
LB-Medium	10 g NaCl 10 g Bacto Trypton (tryptisch) 5 g Hefeextrakt ad. 1000 ml bidest. H ₂ O

LB-Agar	10 g NaCl 10 g Bacto Trypton (tryptisch) 5 g Hefeextrakt 15 g Agar ad. 1000 ml bidest. H ₂ O
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH7,0 für whole mounts: pH4,5
50 x TAE	2 M Tris-HCl pH 8,0 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
GET-Puffer	25 mM Tris-HCl pH8,0 50 mM Glukose 10 mM EDTA

2.3 Antibiotika

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, die sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert wurden. Die jeweils benötigten Lösungen wurden den Wachstumsmedien erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50-60°C zugegeben.

500 x Ampicillin	50 mg/ml in bidest. H ₂ O
100 x Penicillin/Streptomycin (ZK)	1 mg/ml Streptomycin 1000 U/ml Penicillin in bidest. H ₂ O

2.4 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden E. Coli-Zellen des Stammes XL1-Blue verwendet (*supE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ ; F⁻ [proAB⁺ lac^q lacZΔM15 Tn 10(*tet^r)*]*); (Bullock et al., 1987) (Fa. Stratagene, Heidelberg)

2.5 Verwendete Plasmidkonstrukte zur Generierung von *in situ*-Hybridisierungsproben

cNkx5-1/pBluescript KS (+) :

Eine 850 b Gegensinn-RNA-Probe, die den Nukleotiden 415 – 1265 der Hühnchen Nkx5-1 cDNA (EMBL Genbank-Nr. Y15989) entspricht, wird durch *Ava*II-Spaltung des Plasmids und Synthese vom T3-Promotor generiert (Herbrand et al., 1998).

SOHo/pBluescript KS(-) :

Zur Herstellung einer SOHo Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 956 bp langes SOHo cDNA-Fragment in pKS(-) verwendet, das annähernd den gesamten kodierenden Bereich des SOHo-Gens umfaßt. Das Plasmid wird durch *Eco*NI-Spaltung linearisiert, eine 480 b Probe, die carboxyterminale Sequenzen stromabwärts der Homöodomäne enthält, wird vom T3-Promotor synthetisiert (Deitcher et al., 1994).

BMP4/pBluescript KS(+) :

Zur Verfügung gestellt von B. Andrée (Diplomarbeit von B. Andrée), TU-Braunschweig.

Zur Herstellung einer BMP4 Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 780 bp langes BMP4 cDNA-Fragment in pKS(+) verwendet, welches den carboxyterminalen Bereich der BMP4 cDNA unmittelbar stromaufwärts des poly-A enthält. Das Plasmid wird durch *Eco*RI-Spaltung linearisiert, die Probe vom T7-Promotor synthetisiert.

BMP7/pBluescript KS(+)

Zur Verfügung gestellt von B. Andrée (Diplomarbeit von B. Andrée), TU-Braunschweig.

Zur Herstellung einer BMP7 Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 580 bp langes BMP7 cDNA-Fragment in pKS(+) verwendet, das einen konservierten Bereich umfaßt, der 150 bp vor der Erkennungssequenz für die proteolytische Spaltung beginnt. Das Plasmid wird durch *Xba*I-Spaltung linearisiert, die Probe vom T3-Promotor synthetisiert.

Dlx5 aus lambda ZAPII

Zur Herstellung einer Dlx-5 Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 1450 bp langes Dlx-5 cDNA-Fragment verwendet, das den gesamten kodierenden Bereich enthält. Das Plasmid wird durch *Bam*HI-Spaltung linearisiert, die Probe vom T7-Promotor synthetisiert (Pera et al. 1999).

Pax2/pBluescript KS(+)

Zur Herstellung einer cPax2 Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 4,0 kb langes genomisches cPax2-Fragment in pBluescript KS(+) verwendet, welches Exonsequenzen enthält, die den Aminosäuren

228 – 287 der Maus Pax2 cDNA (Dressler et al., 1990) entsprechen. Das Plasmid wird durch SalI-Spaltung linearisiert, die Probe vom T7-Promotor synthetisiert (Herbrand et al., 1998).

hBMP2/pMT7T3-f₁

Zur Verfügung gestellt von G. Gross, Gesellschaft für biologische Forschung, Braunschweig.

Zur Herstellung einer humanen BMP2 Gegensinn-RNA-Probe wurde ein 1,0 kb cDNA-Fragment in pMT7T3-f₁ verwendet. Das Plasmid wird durch EcoRI-Spaltung linearisiert, die Probe vom T3-Promotor synthetisiert.

2.6 Allgemeine gentechnische Verfahren

Standardbedingungen:

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden unter Beachtung entsprechender Sicherheitsvorschriften (z. B. Gentechnikgesetz) durchgeführt. Reagenzien und Proben für enzymatische Reaktionen wurden immer auf Eis gekühlt. Medien, Puffer und andere Arbeitslösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und, wenn erforderlich, durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Gefäße, Pipetten und Pipettenspitzen wurden ebenfalls autoklaviert. Enzymatische Reaktionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit den Puffern des Herstellers durchgeführt.

Gentechnische Standard-Methoden:

Folgende Gentechnologische Standardverfahren wurden, sofern nicht anders angegeben, streng nach oder in Anlehnung an Vorschriften aus den Methodenbüchern „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt: Fällung von Nukleinsäuren; Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren; Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen; Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten; Transformation von E. coli XL1-Blue Zellen; Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli XL1-Blue Zellen im analytischen und präparativen Maßstab; photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren; Agarose-Gelelektrophorese von DNA oder RNA.

2.7 Arbeiten mit Hühnchenembryonen

2.7.1 Inkubation von befruchteten Hühnereiern

Befruchtete Hühnereier wurden bis zum Beginn der Kultivierung bei 4°C gelagert. Die Inkubation erfolgte bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % und einer Temperatur von 37,5 – 38,0°C. Dabei wurden Eier, die für mehr als zwei Tage inkubiert wurden, durch einen automatischen Rollmechanismus alle drei Stunden gewendet. Für die Ermittlung der für ein gewünschtes Embryonalstadium benötigten Inkubationszeit wurde das von Hamburger und Hamilton beschriebene Entwicklungsschema (Hamburger et al., 1951) zugrunde gelegt. Die dort angegebenen Inkubationszeiten wurden um zwei Stunden zur Erwärmung der gekühlten Eier auf Inkubationstemperatur und etwa eine Stunde pro Lagerungstag bei 4°C verlängert.

2.7.2 Präparation von Hühnchenembryonen

Nach der Inkubation werden die Hühnereier oberflächlich mit 70%igem Ethanol sterilisiert und das Ei vorsichtig in eine bakterielle Petrischale mit 10 cm Durchmesser aufgeschlagen, so daß der Embryo auf der Oberseite des Eidotters zu liegen kommt. Mit einer feinen Schere wird der Embryo mit den umliegenden Membranen ausgeschnitten und mit einem Spatel in eine Schale mit PBS oder HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) überführt. Mit Hilfe von Pinzetten und Mikroschere wird der Embryo von den ihn umgebenden Membranen freipräpariert und sein exaktes Entwicklungsstadium bestimmt. Sollen die Embryonen für whole mount *in situ* Hybridisierungen eingesetzt werden, werden sie ü.N bei 4°C in 4% PFA fixiert. Sollen die Embryonen zur Isolierung von Gewebe für die Transplantation oder Explantation verwendet werden, können sie für kurze Zeit in HBSS auf Eis gelagert werden.

2.7.3 Isolierung von Spendergewebe für Transplantationsexperimente

Die isolierten Embryonen werden gründlich in HBSS gewaschen. Aus den Embryonen werden mit Hilfe von Nadeln aus 100 µm starkem Wolframdraht, die in der Flamme des Bunsenbrenners geschärft wurden, transversale Körperscheiben auf der Höhe der Rhombomere 5/6 ausgeschnitten. Zur Isolierung von Hinterhirn- bzw. Plakodenektoderm werden diese Körperscheiben in Dispaselösung (1 mg/ml in HBSS unter Zusatz von 50 µl DNase I-Lösung (10 U/µl)) überführt. In Dispaselösung werden zunächst endodermale und mesodermale Derivate vom Ektoderm abgelöst. Anschließend wird das Ohrektoderm zuerst medial vom Hinterhirn und dann lateral vom

angrenzenden Oberflächenektoderm abgetrennt. Zur Isolation von Rhombomer-5/6-Hälften wird das Hinterhirn entlang der Längsachse mit der Wolframdrahtnadel in zwei Hälften getrennt. Die isolierten Ektodermstücke werden zurück in HBSS überführt und mehrmals gewaschen, um Dispaserückstände vor der Transplantation vollständig zu entfernen, und können bis zur Transplantation für kurze Zeit auf Eis gelagert werden.

2.7.4 *In ovo* Manipulationen an Hühnchenembryonen

Vorbereitung der Wirtsembryonen:

Das den Wirtsembryo enthaltende Ei wird mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Am dickeren Ende des Eies werden mit einer Spritze etwa 3 ml Albumin abgezogen. Damit beim Öffnen des Eies keine Schalenreste ins Innere gelangen, wird die Ei-Oberseite mit Tesafilm abgeklebt. Mit einer Schere wird dann ein ovales Fenster in die Schale geschnitten. Damit der Embryo nicht austrocknet, werden mit einer Pasteurpipette einige Tropfen Antibiotika enthaltende Chick-Ringer-Lösung (10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin) auf den Embryo getropft. Durch sub-blastodermale Injektion von etwa 100 µl verdünnter schwarzer Tinte (Pelikan, 1:15 in Ringerlösung mit Penicillin und Streptomycin) wird der Embryo besser sichtbar gemacht. Mit Hilfe einer geschärften Wolframdrahtnadel wird die Vitellinmembran im Operationsbereich entfernt.

Transplantation von Spendergewebe:

Das isolierte Gewebestück wird mit Hilfe einer Pipette in einem möglichst geringem Puffervolumen im Bereich der geöffneten Vitellinmembran auf den Wirtsembryo aufgebracht. Mit einer geschärften Wolframdrahtnadel wird an der Implantationsstelle eine Vertiefung geschaffen, die groß genug ist, um das Implantat vollständig aufzunehmen. Mit einer stumpfen Wolframdrahtnadel wird das Spendergewebe in dieser Vertiefung positioniert. Das Operationsfenster im manipulierten Ei wird mit Gewebeband (Beiersdorf) verschlossen und das Ei für die gewünschte Zeitspanne weiterinkubiert.

Implantation von Zellaggregaten:

Aggregate von Wachstumsfaktor-produzierenden Zellen werden kurz in PBS gewaschen und mit Hilfe einer Pipette in das wie oben beschrieben vorbereitete Wirtsei überführt. Mit einer geschärften Wolframdrahtnadel wird an der Implantationsstelle ein schmaler Schnitt in den Wirtsembryo eingeführt, in den das Zellaggregat mit Hilfe einer stumpfen Wolframdrahtnadel

inseriert wird. Das Operationsfenster im manipulierten Ei wird mit Gewebefixationsband (Beiersdorf) verschlossen und das Ei für die gewünschte Zeitspanne weiterinkubiert.

Implantation von Goldbarrieren:

Für diese Experimente wurde eine für die Elektronenmikroskopie hergestellte Goldfolie einer definierten Dicke von 8µm (Fa. Goodfellow) verwendet. Mit einer Mikroschere werden aus dieser Folie unter dem Binokular Rechtecke der Länge eines halben Hinterhirns und der Breite, die etwa der eineinhalbfachen Höhe des Neuralrohrs entspricht, zurechtgeschnitten und in eine kleine Petrischale mit HBSS überführt. Dann werden die Rechtecke im Puffer entlang der oberen Längskante rechtwinklig umgebogen, um zu verhindern, daß die Implantate durch das Wachstum der Wirtsembryonen zu weit nach ventral absinken.

Mit einer feinen Pinzette wird die Goldbarriere in ein wie oben beschrieben vorbereitetes Wirtsei überführt. Im Wirtsembryo wird mit einer geschärften Wolframdrahtnadel zwischen Hinterhirn und Ohrplakode ein passender Schnitt eingeführt, in den die Goldbarriere mit einer stumpfen Wolframdrahtnadel inseriert wird. Dabei wird die Goldbarriere so orientiert, daß die umgebogene Kante an der dorsalen Seite des Embryos liegt, damit die Barriere nicht nach ventral absinken kann. Das Operationsfenster im manipulierten Ei wird mit Gewebefixationsband (Beiersdorf) verschlossen und das Ei für die gewünschte Zeitspanne weiterinkubiert.

2.7.5 Explantation von embryonalem Hühnchengewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Explantkulturen von Ohrgrubenektoderm angelegt. Dabei wurde das Ektoderm isoliert von und zusammen mit den umliegenden Geweben *in vitro* kultiviert. Dazu wurden zunächst Hühnerembryonen der H.H.-Entwicklungsstadien 13-14 (18-23 Somiten) (Hamburger et al., 1951) in HBSS-Puffer präpariert (2.7.2), transversale Körperscheiben, welche beide Ohrgruben vollständig enthalten, wie in 2.7.3 beschrieben, herausgeschnitten und der Länge nach durchtrennt. Zur Isolierung der Ohrgruben wurde die eine Hälfte der Körperscheibe in HBSS mit Dispase-Lösung (2.7.3) überführt, die Ohrgrube mit Hilfe einer Wolframdrahtnadel aus dem umliegenden Gewebe herausgeschält und mehrmals in HBSS gewaschen, um Dispaserückstände zu entfernen. Von der anderen Körperscheibenhälfte wurde der ventrale Anteil in HBSS ohne Zusatz von Dispase mit einer scharfen Wolframdrahtnadel abgeschnitten.

Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen wurden mit 0,1% Gelatine/PBS beschichtet. Die isolierten Gewebestücke wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) mit 10 U/ml

Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 20 mM Glutamin in einem feuchtem Inkubator mit einem CO₂-Gehalt 10% bei 37°C für 20 oder 40 Stunden inkubiert.

2.8 Zellbiologische Methoden

Die beschriebenen Methoden lehnen sich an Protokolle an, wie sie in „Cells; A Laboratory Manual“ (Spector et al., 1998), „Molecular cloning II“ (Kapitel 6, Gorman, 1985) und „Basic Cell Culture“ (Davies et al., 1994) beschrieben sind. Grundmedien und Zusätze für die Kulturmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Gibco Life Science (Heidelberg) bezogen.

2.8.1 Passagierung und Kryokonservierung von Zellen

Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale werden die Zellen zweimal mit einem kleinen Volumen PBS (ca. 3 ml bei einer Schale mit 10 cm Durchmesser, 1,5 ml bei einer Schale mit 6 cm Durchmesser) gewaschen und dann bei RT für drei bis fünf Minuten mit 2 ml (1 ml bei kleiner Schale) einer einfach konzentrierten Trypsin/EDTA-Lösung (TE, ZK) in PBS behandelt. Die trypsinisierten Zellen werden in einem fünffachen Volumen Kultivierungsmedium aufgenommen und abzentrifugiert, um TE-Rückstände zu entfernen. Das Zellpellet wird in einem geeigneten Volumen Kultivierungsmedium aufgenommen, die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen in der gewünschten Dichte replattiert.

Zur Kryokonservierung werden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert, abzentrifugiert und in Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 10% DMSO und zusätzlich 10% FCS) in einer Zellzahl von ca. 1×10^6 Zellen/ml aufgenommen und jeweils 1 ml der Zellsuspension in 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden ü.N. bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung werden die Zellen rasch in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturschalen der gewünschten Größe plattiert.

2.8.2 Kultivierung und Aggregation von Wachtel-Q2bn Zellen

Die kodierende Region des humanen BMP2 Gens (hBMP2) wurde in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung in den replikationsdefekten retroviralen Vektor pCRNCM inseriert. Beide Vektoren, hBMP2/pCRNCM und Kontroll/pCRNCM, wurden stabil in Q2bn-Zellen transfiziert (Duprez et al., 1996) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

BMP2-produzierende Zellen und Kontrollzellen werden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% in folgendem Medium kultiviert: 45% Ham's F12, 45% DMEM, 2% Hühnerserum, 8% FCS, 1/100 Vol. Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 1/100 Vol. Glutamin-Stammlösung und 800 mg/l G418. Zur Passagierung und Verbreiterung werden die Zellen bei 90%iger Konfluenz nach Standardprotokoll durch Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und im Verhältnis 1:3 bis 1:8 ausgedünnt replattiert. Im Abstand von 48 Stunden wird ein Mediumswechsel durchgeführt.

Für die Implantation geeignete kugelförmige Zellaggregate erhält man, indem man BMP2 produzierende Zellen und Kontrollzellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert, unter milden Bedingungen unvollständig trypsinisiert und über Nacht in unbeschichteten, bakteriellen Petrischalen mit 6cm Durchmesser weiterinkubiert. Unter diesen Bedingungen bilden die Zellen Aggregate unterschiedlicher Größe aus, die vor der Implantation unter dem Stereomikroskop selektiert werden müssen.

2.8.3 Kultivierung und Aggregation von CHO.B3.A4-Zellen

CHO.B3.A4 Zellen, die *Xenopus*-Noggin exprimieren, wurden freundlicherweise von Dr. Richard Harland, UC Berkley (Lamb et al., 1993) zur Verfügung gestellt.

Noggin-produzierende CHO-Zellen werden in α MEM mit Glutamax ohne Nukleotide (Gibco), dem 10% dialysiertes fötales Kälberserum (FCS), 80 μ M Methotrexat ([+]-Methopterin, Sigma), 1% Natriumpyruvat, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren und 1/100 Vol. Penicillin-/Streptomycin-Stammlösung zugesetzt werden, bei einem CO₂-Gehalt von 5% und 37°C kultiviert. Für Kontrollversuche verwendete parentale CHO dhfr⁽⁻⁾-Zellen werden unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zusatz des Selektors Methotrexat, kultiviert. Die verwendeten Zellkulturschalen werden zuvor mit 1%iger Gelatinelösung/PBS beschichtet. Zur Passagierung und Verbreiterung werden die Zellen bei 90%iger Konfluenz nach Standardprotokoll durch Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 ausgedünnt replattiert. Im Abstand von 48 Stunden wird ein Mediumswechsel durchgeführt.

Für die Implantation geeignete, kugelförmige Zellaggregate erhält man, indem man CHO.B3.A4-Zellen und Kontrollzellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert, unter milden Bedingungen unvollständig trypsinisiert und in unbeschichteten bakteriellen Petrischalen mit 6 cm Durchmesser für zwei bis drei Tage weiterinkubiert. Unter diesen Bedingungen bilden die Zellen Aggregate unterschiedlicher Größe aus, die vor der Implantation unter dem Stereomikroskop selektiert werden müssen.

2.9 Immunohistochemische Arbeitsmethoden

2.9.1 Whole mount *in situ* Hybridisierung

Das in dieser Arbeit angewandte Hybridisierungsverfahren wurde von David Wilkinson (National Institute for Medical Research, London) nach einem Protokoll von Ron Conlon (Mt.Sinai, Toronto) und Phil Ingham (Oxford) entwickelt.

Probensynthese:

Ribonukleotid-Mix: je 10 mM GTP, CTP und ATP
 6,5 mM UTP
 3,5 mM Digoxigenin-11-UTP

Das für die Probensynthese verwendete Plasmid muß zunächst durch Spaltung mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert werden, damit das hergestellte Transkript keine Sequenzen des Plasmidvektors enthält. Die Vollständigkeit der Spaltung wird im Agarosegel überprüft, der Ansatz mit Chloroform extrahiert, präzipitiert und in einer Konzentration von 1 µg/µl in bidest. H₂O aufgenommen.

1 µg des linearisierten Plasmids, 2 µl Ribonukleotid-Mix und 50 U RNasin werden im mitgelieferten Transkriptionspuffer mit 20 U RNA-Polymerase (üblicherweise T3, T7 oder SP6) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubiert. Enthält der mitgelieferte Transkriptionspuffer kein DTT, so muß es dem Reaktionsansatz in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt werden. Im Anschluß an die Probensynthese wird das DNA-Template für 15 Minuten bei 37°C mit 20 U ribonukleasefreier DNase abgebaut. Das Reaktionsvolumen wird mit TE auf 100 µl erhöht, die RNA durch Zugabe von 10 µl 4 M LiCl und 300 µl Ethanol präzipitiert, pelletiert und in 100 µl TE aufgenommen. Ein Aliquot des Ansatzes wird zur Kontrolle der Probensynthese im Agarosegel aufgetrennt. Die Intensität der RNA-Bande sollte deutlich stärker sein als die des als Template eingesetzten linearisierten Plasmids.

Whole mount *in situ* Hybridisierung

Präparation und Vorbehandlung der Embryonen:

Wenn nicht anders angegeben, werden die Waschschritte für fünf Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Embryonen werden in PBS zügig und vollständig von extraembryonalen Membranen befreit, in PBS gewaschen und ü.N. bei 4°C in 4%iger Paraformaldehydlösung/ PBS fixiert. Um unspezifische Färbung in embryonalen Hohlräumen, vor allem Hirnbläschen und Herz, zu verhindern, werden Hohlräume vorsichtig mit einer feinen Pinzettenspitze geöffnet.

Die fixierten Embryonen werden zweimal bei 4°C in PBT gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75 % und zweimal 100% Methanol/ PBT) dehydriert.

Die dehydrierten Embryonen werden mindestens 30 Minuten bei –20°C gelagert, dann durch Waschschrte in einer fallenden Methanolreihe rehydriert und dreimal mit PBT gewaschen. Die Embryonen werden für eine Stunde bei RT in 6% H₂O₂/PBT behandelt, um die Embryonen aufzuhellen und endogene Phosphatase-Aktivität zu unterdrücken, und dreimal mit PBT gewaschen. Je nach Größe werden die Embryonen für 2-15 Minuten bei RT mit 10µg/ml Proteinase K/PBT behandelt. Die Proteinase-Reaktion wird durch Waschen in 2 mg/ml Glycin/PBT gestoppt und die Embryonen zweimal mit PBT gewaschen.

Die Embryonen werden für 20 Minuten bei RT in 4% Paraformaldehyd/PBT mit 0,2% Glutardialdehyd zwischenfixiert und zweimal mit PBT gewaschen.

Prähybridisierung und Hybridisierung:

Prähybridisierungslösung: 50% Formamid
 5 x SSC, pH4,5
 50 µg/ml Hefe-tRNA
 50 µg/ml Heparin
 1% SDS

Die Embryonen werden für mindestens eine Stunde bei 70°C in vorgewärmter Prähybridisierungslösung inkubiert. Falls erforderlich können prähybridisierte Embryonen in Prähybridisierungslösung bei –20°C gelagert werden. Die Embryonen werden ü.N. im schüttelnden Wasserbad bei 70°C mit einer Probenkonzentration von 1 µg/ml in frischer Prähybridisierungslösung hybridisiert.

Posthybridisierungs-Waschschrte:

Lösung 1: 50% Formamid
 5 x SSC, pH4,5
 1% SDS

Lösung 2:	0,5 M NaCl
	10 mM Tris HCl, pH7,5
	0,1% Tween-20
Lösung 3:	50% Formamid
	2 x SSC, pH4,5
TBST:	1/10 Vol. 10 x TBS
	1% Tween-20
	2 mM Levamisol

Die Embryonen werden zweimal 30 Minuten bei 70°C in Lösung 1, 10 min bei 70°C in einem Gemisch aus 0,5 Volumen Lösung 1 und 0,5 Volumen Lösung 2 und dreimal bei RT in Lösung 2 gewaschen. Die verwendete Hybridisierungslösung kann bei -20°C gelagert und bis zu dreimal wiederverwendet werden.

Einzelsträngige RNA wird durch Behandlung mit 100 µg/ml nicht gekochter RNaseA in Lösung 2 für zweimal 30 Minuten bei 37°C abgedaut und die Embryonen je einmal in Lösung 2 und Lösung 3 gewaschen. Die Embryonen werden zweimal 30 Minuten bei 65°C in Lösung 3 gewaschen. Die Embryonen werden dreimal in TBST gewaschen.

Antikörper- und Farbreaktion:

Inaktiviertes Schafserum: Schafserum wird durch 30-minütiges Erhitzen bei 70°C inaktiviert. Dabei muß das Serum mehrmals geschüttelt werden, um die Ausbildung von Klumpen zu verhindern. Inaktiviertes Schafserum kann bei -20°C gelagert werden.

Hühnchen-Embryopuder: Sechs bis acht Tage alte Hühnchenembryonen werden in einem kleinen Volumen PBS homogenisiert, mit vier Volumen eiskaltem Azeton versetzt und für 30 Minuten auf Eis belassen. Das Gewebe wird für zehn Minuten bei 4000 Upm pelletiert. Das Pellet wird mit eiskaltem Azeton gewaschen, erneut zentrifugiert, auf Filterpapier an der Luft getrocknet und in einem Mörser fein gemahlen. Das Puder kann in einem luftdichten Gefäß bei 4°C mehrere Monate gelagert werden.

Präadsorbierter Antikörper: Zur Herstellung von 2 ml präadsorbierter Antikörperlösung werden 3 mg Embryopuder in 0,5 ml TBST für 30 Minuten auf 70°C erhitzt und auf Eis abgekühlt, 5 µl inaktiviertes Schafserum und 1 µl Anti-Digoxigenin Antikörper hinzugegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C auf einem Rotationsinkubator belassen. Der Ansatz wird 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 1% Schafserum/TBST auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt.

1 x NTMT: 100 mM NaCl
100 mM Tris-HCl, pH9,5
50 mM MgCl₂
0,1% Tween-20
2 mM Levamisol

Färbelösung: 4,5 µl NBT/ml und 3,5 µl BCIP/ml in 1 x NTMT

Die Embryonen werden für mindestens eine Stunde bei RT in 10 % inaktiviertem Schafserum in TBST vorinkubiert. Die Inkubation mit dem präadsorbierten Antikörper erfolgt ü.N. bei 4°C auf dem Schüttler. Die Embryonen werden für dreimal fünf Minuten und fünfmal eine Stunde bei RT und ü.N. bei 4°C in TBST gewaschen. Die verwendete Antikörperlösung kann einige Monate bei 4°C gelagert und bis zu dreimal wiederverwendet werden.

Die Embryonen werden dreimal zehn Minuten mit NTMT gewaschen und bei RT im Dunkeln in frisch angesetzter Färbelösung inkubiert. Sobald die Färbelösung von gelb nach rosa umschlägt, muß sie durch frische Färbelösung ersetzt werden. Ist die Farbreaktion in dem gewünschten Maß abgelaufen, werden die Embryonen zügig dreimal in PBT gewaschen und in 0,2 mM EDTA/PBS bei 4°C gelagert.

Fotografie von whole mount hybridisierten Embryonen:

Für die Fotografie der Embryonen unter dem Binokular wurden hochauflösende 64 ASA Kunstlicht-Diafilme verwendet. Der zu fotografierende Embryo wird in eine Petrischale, die etwa 5 mm hoch mit 1% Agar in Wasser beschichtet ist, überführt, mit einer geringen Menge PBS überschichtet und in der gewünschten Lage (gegebenenfalls mit Hilfe von feinen Insektennadeln) fixiert. Der Embryo wird seitlich so mit Kaltlichtquellen angeleuchtet, daß keine Lichtreflexe oder Schatten entstehen. Um im Körperinneren liegende Expressionsdomänen besser sichtbar zu machen, kann das embryonale Gewebe aufgeklärt werden, indem der Embryo über einen Zwischenschritt in 50% Glyzerin/PBS in 80% Glyzerin/PBS überführt wird. Belichtete Diafilme werden im E6 3-Bad-Prozess entwickelt.

2.9.2 Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom

Gelatine/Albumin-Einbettungsmedium:	0,49 g Gelatine
	30 g Hühnerei-Albumin
	20 g Saccharose
	in 100 ml PBS lösen
	in Aliquots bei -20°C lagern.

Die Embryonen werden zur Benetzung des Gewebes einige Minuten in Gelatine/Albumin-Einbettungsmedium inkubiert. Aliquots kalten Einbettungsmediums werden in zwei Gefäßen vorgelegt. Das erste Aliquot wird luftblasenfrei mit 1/10 Volumen einer 25%igen Glutardialdehydlösung vermischt und in eine Einbettungsform überführt. Der Embryo wird zügig in der gewünschten Orientierung in die Gelatine-Albuminschicht transferiert. Das zweite Aliquot des Einbettungsmediums wird mit der Glutardialdehydlösung versetzt und luftblasenfrei in einer dicken Schicht auf den Embryo aufgebracht. Der Block wird zum Auspolymerisieren und Aushärten für einige Stunden bei RT gelassen und dann bis zur Verwendung luftdicht verpackt im Kühlschrank gelagert. Vor dem Schneiden wird der Block mit dem Skalpell zurechtgeschnitten und mit Cyan-Acrylat-Sekundenkleber auf dem Objektisch des Vibratoms befestigt. Die Schnitte werden in der Pufferwanne mit einer Pinzette auf Objektträger aufgezoogen und mit 80% Glycerin/PBS unter einem Deckgläschen verschlossen. Die Objektträger können mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung können die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt werden, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Dadurch wird jedoch gleichzeitig das Herausdiffundieren des Farbstoffs aus dem Gewebe und damit die Ausbildung blauer Höfe rund um die Schnitte begünstigt.

Die Fotografie der Schnitte erfolgt im Hellfeld unter dem Mikroskop. Die Plastizität der Gewebestrukturen kann durch Verwendung einer Nomarski-Optik hervorgehoben werden.

2.9.3 Herstellung von Gefrier-Gewebeschnitten

Die isolierten Embryonen bzw. die isolierten Gewebestücke werden über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler in 4% PFA/PBS fixiert. Dann werden die Embryonen/Gewebestücke bei RT solange in 15% Saccharose/PBS äquilibriert, bis sie in der Lösung absinken, dann in eine geeignete Einbettungsform in Poly-Freeze-Tissue-Freezing-Medium (Fa. Polysciences, Warrington, USA) überführt und auf Trockeneis schnell eingefroren. Die Blöcke werden mit einem Skalpell auf die gewünschte Größe und Form zurechtgeschnitten und mit Einbettungsmedium auf dem Objektisch

des Kryotoms befestigt. Kryoschnitte können mit dem verwendeten Kryotom Jung Frigocut 2800E (Fa. Jung) standardmäßig in einer Dicke von 6 µm bis 30 µm angefertigt werden.

2.9.4 *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten Proben auf Gefrierschnitten

Die Hybridisierung von Gefrierschnitten mit Digoxigenin markierten Proben wird mit unten angegebenen Veränderungen gemäß dem Protokoll für die „whole mount“-Hybridisierung ganzer Embryonen (Abschnitt 2.9.2) durchgeführt.

Zur Handhabung der Schnitte werden bei allen Waschschritten Glasküvetten mit entsprechenden Einsätzen für die Objektträger verwendet. Bei Arbeitsschritten, die aus Kostengründen in einem möglichst geringen Volumen durchgeführt werden müssen (Hybridisierung, Antikörper- und Farbreaktion), wird die Lösung direkt auf den Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckgläschen verschlossen. Damit die Schnitte dabei nicht austrocknen, werden sie in feuchten Kammern inkubiert. Zur Entfernung der Deckgläschen werden die Objektträger in Waschpuffer überführt, bis die Deckgläschen von alleine vom Objektträger gleiten.

Die zu hybridisierenden Schnitte werden zunächst über eine Methanolreihe dehydriert, für 30 Minuten bei -20°C in Methanol gelagert und rehydriert. Die H₂O₂-Behandlung wird auf 30 Minuten verkürzt. Die ProteinaseK-Behandlung wird für 10 Minuten in Glasküvetten durchgeführt. Eine RNase-Behandlung im Anschluß an die Hybridisierung entfällt und die TBST-Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation werden auf sechsmal 30 Minuten verkürzt.

2.9.5 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Einbettung von Gewebestücken in Paraffin ermöglicht die Herstellung dünner Gewebeschnitte im Bereich von 4 – 15 µm mit einem Mikrotom. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Paraffinschnitte für histochemische Hämatoxylin/Eosin-Anfärbungen verwendet.

Zur Einbettung in Paraffin werden die Embryonen/Gewebestücke in einem geeigneten Fixierungsmittel (z. B. 4% PFA/PBS) bei 4°C je nach Größe für 4 bis 48 Stunden fixiert. Die Embryonen/Gewebestücke werden zweimal zehn Minuten bei 4°C in PBS gewaschen, dann in einer steigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% Ethanol/PBS und zweimal 100% Ethanol) für jeweils 20 – 30 Minuten dehydriert und ü.N. bei RT in 100%igem Ethanol belassen. Die Embryonen/Gewebestücke werden zweimal für 30 Minuten bei RT in Xylol und für 30 Minuten in einem auf 60°C vorgewärmten Gemisch aus 0,5 Volumen Xylol und 0,5 Volumen

Paraffin gewaschen und dann bei 60°C in reines Paraffin überführt. Nach jeweils ein bis zwei Stunden werden die Embryonen/Gewebestücke in frisches Paraffin überführt und ü.N. bei 60°C im dritten Paraffin belassen. Vor der Einbettung wird das Paraffin ein weiteres Mal gewechselt, die Embryonen auf Eis in eine geeignete Einbettungsform mit flüssigem Paraffin überführt und mit Pinzetten in der gewünschten Lage orientiert.

Der Paraffinblock wird mit einem heißen Messer auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten und mit flüssigem Paraffin auf einen geeigneten Träger aufgeschmolzen. Die Schnitte werden mit einer Pinzette in ein 37°C -Wasserbad überführt, dort einige Minuten geglättet, auf beschichtete Objektträger (siehe unten) aufgezogen und für mindestens eine Stunde bei 37°C auf einer Wärmeplatte getrocknet.

Zur besseren Anheftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern werden die Objektträger vor der Benutzung nach Herstellerprotokoll mit Vectabond-Reagenz (Fa. Linearis) beschichtet. Beschichtete Objektträger können über einen langen Zeitraum bei RT gelagert werden.

2.9.6 Immunohistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen von Hühner- und Mausembryonen mit einem polyklonalen anti-Pax2 Antikörper (Fa. Zymed) auf Gefrierschnitten durchgeführt. Die Signalverstärkung durch einen biotinylierten Sekundärantikörper und Biotin/Streptavidin-Reaktion erfolgten mit Hilfe des ABC-Kits (Fa. Vector) gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Wenn nicht anders angegeben, werden die Waschschritte für zwei Minuten und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Gefrierschnitte werden für fünf Minuten in 4% PFA/PBS fixiert und dreimal in PBS gewaschen. Die Schnitte werden für zehn Minuten in einem Gemisch aus neun Volumen Methanol und einem Volumen H₂O₂ gebleicht und dreimal in PBS gewaschen. Die Schnitte werden für zehn Minuten mit 0,1% Triton-X100/PBS behandelt, dreimal in PBS gewaschen, für zehn Minuten in 5% Pferdeserum/PBS abgeblockt und für eine Stunde mit dem primären Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/µl in PBS inkubiert. Der in dieser Arbeit verwendete anti-Pax2 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS eingesetzt. Die Schnitte werden viermal in 0,1% Triton-X100/PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären, biotinylierten anti-Kaninchen Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 200 in PBS inkubiert. Nach vier Waschschritten in PBS werden die Schnitte für 30 Minuten mit ABC-Reagenz behandelt und dreimal in PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wird DAB in einer Konzentration von 1 mg/ml in 100 mM Tris pH7,2 gelöst und durch Zugabe von 0,5 µl/ml H₂O₂ aktiviert. Die Farbreaktion erfolgt für wenige Minuten unter Deckgläschen und wird durch intensives Waschen der Objektträger in PBS gestoppt.

2.9.7 Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode

Der als Apoptose bezeichnete Prozeß des programmierten Zelltods ist durch Fragmentierung der DNA, bei der freie 3'-OH Termini entstehen, gekennzeichnet. Diese freien 3-OH Termini können mit Hilfe des Enzyms Terminale Nukleotidyl Transferase (TdT) mit modifizierten Nukleotiden markiert werden, diese wiederum spezifisch von einem entsprechendem Antikörper, an den ein Enzym zur Umsetzung eines chromogenen Substrats gekoppelt ist, erkannt werden. So können die apoptotischen Zellen schließlich durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Der Nachweis apoptotischer Zellen an ganzen Embryonen erfolgte mithilfe des Apo-Tag-Peroxidase-in-situ-Apoptose-Detection-Kit (Fa. Intergen, Katalog-Nr. S7100) in Abwandlung des vom Hersteller angegebenen, zur Anwendung an Gewebeschnitten entwickelten Protokolls. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeitsschritte für fünf Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Embryonen werden ü. N. in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert, über eine aufsteigende Methanolreihe (25%, 50% und 75% Methanol/PBT, zweimal 100% Methanol) dehydriert, mindestens 30 Minuten bei -20°C in Methanol gelagert und durch eine umgekehrte, absteigende Methanolreihe rehydriert. Die Embryonen werden dreimal mit PBT gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinase K (20 µg/ml in PBT) behandelt, die Proteinase-Reaktion durch einen Waschschrift mit 2 mg/ml Glycin/PBT gestoppt und die Embryonen dreimal mit PBT gewaschen. Die Embryonen werden für eine Stunde bei RT in 6% H₂O₂/PBT behandelt, um die Embryonen aufzuhellen und endogene Phosphatase-Aktivität zu unterdrücken, und erneut dreimal mit PBT gewaschen. Vor der TdT-Reaktion werden die Embryonen zur Reduktion des benötigten Reaktionsvolumens in 1,5 ml Eppendorfer-Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten im vom Hersteller mitgelieferten Äquilibrierungspuffer belassen. Die anschließende TdT-Markierungsreaktion wird für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und durch einen 15-minütigen Waschschrift bei RT im mitgelieferten „Stop- und Waschpuffer“ beendet. Die Embryonen werden einmal mit PBT und dreimal in TBST (siehe 2.9.1.2) gewaschen. Anstelle der vom Hersteller vorgesehenen Antikörperreaktion mit einem Peroxidase gekoppelten αDIG-Antikörper wird im folgenden Schritt ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter αDIG-Antikörper (Boehringer Mannheim) eingesetzt, da die von der alkalischen Phosphatase katalysierte NBT/BCIP-Farbreaktion an ganzen Embryonen im allgemeinen weniger unspezifische Hintergrundfärbung verursacht als die von der Peroxidase katalysierte DAB-Farbreaktion. Der Antikörper wird, wie in 2.9.1.2 beschrieben, präadsorbiert und 1:2000 verdünnt eingesetzt. Die Embryonen werden für mindestens eine Stunde mit 10% inaktiviertem Schafserum (siehe 2.9.1.2) in TBST vorinkubiert und dann ü.N. bei 4°C mit dem präadsorbierten Antikörper inkubiert. Die

Embryonen werden dreimal kurz und fünfmal für eine Stunde bei RT und dann ü.N. bei 4°C in TBST gewaschen. Die Embryonen werden dreimal zehn Minuten in NTMT (siehe 2.9.1.2) gewaschen und im Dunkeln bei RT mit frisch angesetzter Färbelösung (siehe 2.9.1.2) inkubiert. Wenn die Farbreaktion in dem gewünschten Maß abgelaufen ist, werden die Embryonen zügig dreimal in PBT gewaschen und in 0,2 mM EDTA/PBS bei 4°C gelagert.

3. Ergebnisse

Besser als alle anderen Modellsysteme der Vertebratenentwicklung erlaubt das Hühnchen operative Manipulationen an lebenden Embryonen und eignet sich somit hervorragend zur Untersuchung von Gewebeinteraktionen. Wie eingangs beschrieben werden bereits in der Ohranlage, in Ohrplakode und Ohrvesikel, regional begrenzte Expressionsmuster von Kontrollgenen wie *Nkx5-1* und *Pax2* etabliert und so zukünftige Kompartimente des Innenohrs spezifiziert. Inwieweit solche Regionalisierungsprozesse durch Wechselwirkungen mit benachbarten Geweben gesteuert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Transplantations-, Implantations- und Explantationsexperimente in Hühnchenembryonen untersucht. Durch die Analyse regionalisiert exprimierter Gene war es hierbei möglich, das Schicksal der Transplantate über morphologische Veränderungen hinaus molekular zu beschreiben. Zum besseren Verständnis der durchgeführten Manipulationen sollen im ersten Abschnitt des Ergebnisteils zunächst die Expressionsmuster der verwendeten Markergene vergleichend vorgestellt werden. Im zweiten Teil werden dann die Transplantations- und Implantationsexperimente ausführlich dargestellt.

3.1 Die Transkriptionsfaktoren *cNkx5-1*, *SOHo* und *Pax2* sowie das Signalmolekül *BMP4* werden in unterschiedlichen Bereichen des frühen Innenohrs exprimiert.

Die molekulare Analyse der nachfolgend beschriebenen Manipulationen stützt sich in erster Linie auf vier regulatorische Moleküle: Die beiden Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren *cNkx5-1* (Herbrand et al., 1998) und *SOHo* (Deitcher et al., 1994), den „paired“-Homöodomänen Transkriptionsfaktor *Pax2* (Nornes et al., 1990) und das Signalmolekül *BMP4* (Wu et al., 1996). Alle vier Moleküle werden bereits kurz nach der Ausbildung der Ohrplakode aktiviert und ihre Expression im weiteren Verlauf der Innenohrmorphogenese auf unterschiedliche Bereiche des Epitheliums begrenzt. Die aus der transgenen Inaktivierung der Mausgene resultierenden Phänotypen und/oder funktionelle Untersuchungen der Hühnchengene zeigten für alle vier Gene essentielle Funktionen in der Morphogenese verschiedener Innenohrkompartimente.

Nkx5-1 wurde bei der Suche nach Homologen des *Drosophila* NK1-Gens identifiziert (Bober et al., 1994). Der räumliche und zeitliche Expressionsverlauf des *Nkx5-1*-Gens mit einer strikten Beschränkung der Transkripte auf Aspekte des sich entwickelnden Innenohrs (Rinkwitz-Brandt et al., 1995 und 1996) ließ eine Funktion von *Nkx5-1* in der Morphogenese dieses Organs vermuten. Die transgene Inaktivierung des *Nkx5-1/Hmx-3*-Gens demonstrierte seine Beteiligung bei der Kontrolle der Bogengangmorphogenese (Hadrys et al., 1998; Wang et al., 1998). Klonierung und

Charakterisierung der Hühnchen Nkx5-1-cDNA wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit „Klonierung der cDNA für das innenohrspezifische Homöoboxgen Nkx-5.1 beim Hühnchen und Untersuchungen zu seinem Expressionsmuster“ begonnen. Die Konservierung der Nukleinsäuresequenz und des räumlichen und zeitlichen Expressionsverlaufs zeigten, daß cNkx5-1 das Ortholog des Maus Nkx5-1-Gens darstellt.

Das Homöoboxgen SOHo (Sensory Organ Homeobox Gene 1) wurde 1994 von D. Deitcher als das seinerzeit früheste spezifisch in Sinnesorganen exprimierte Homöoboxgen beschrieben. Neben dem Auge wird SOHo vornehmlich im sich entwickelnden Innenohr exprimiert (Deitcher et al., 1994). Innerhalb der Homöodomäne weisen SOHo und cNkx5-1 auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 90% auf und können als Mitglieder derselben Genfamilie angesehen werden.

Eine im Innenohr zu Nkx5-1 annähernd komplementäre Transkriptverteilung mit einer klaren Beschränkung der Expression auf die prospektive cochleäre Region zeigt der „paired“-Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Pax2 (Rinkwitz-Brandt et al. 1995 und 1996). In Übereinstimmung mit diesem Expressionsmuster führte die transgene Inaktivierung von Pax2 in der Maus zum Verlust der Cochlea und von ventralen Anteilen des Sacculus (Torres et al., 1996).

BMP4 ist ein Mitglied der TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) Genfamilie. Während der Embryonalentwicklung ist BMP4 für frühe Musterbildungsprozesse im Mesoderm ebenso wichtig wie für die Organogenese des Herzens, der Zähne und der Extremitäten. Im Innenohr des Hühnchens wird BMP4 in distinkten Foci exprimiert, die den prospektiven Bereichen der Sinnesepithelien entsprechen. Aufgrund dieses Aktivitätsmusters wird eine Funktion von BMP4 in der Ausbildung der Sinnesepithelien diskutiert (Wu et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkriptverteilungen für cNkx5-1, SOHo und Pax2 an Embryonen ausgewählter Entwicklungsstadien zwischen Embryonaltag (E) 1,5 und E4,0 (H.H.-Stadien 8-27) durch „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin markierten Gegen-sinn-RNA-Proben vergleichend untersucht. Die genaue Transkriptverteilung entlang der dorsoventralen und mediolateralen Achsen wurde anschließend anhand von Vibratomschnitten bestimmt. Die Expressionsmuster der drei Gene im Ohrplakoden-, Ohrgruben- und Ohrvesikelstadium werden in Abbildung 6 dargestellt. Die Expression des Hühnchen BMP4-Gens in den entsprechenden Phasen der Innenohrentwicklung wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Wu et al., 1996).

Wie sein Ortholog in der Maus wird cNkx5-1 im Hühnchen im 10 Somitenstadium (H.H.-Stadium 10) im rostromedialen Aspekt der Ohrplakode, in enger Nachbarschaft zum fünften Rhombomer des Hinterhirns aktiviert (Abb. 6 A und E). Etwa zeitgleich, im 11 Somitenstadium, beginnt die Expression des verwandten SOHo-Gens. SOHo-Transkripte sind jedoch komplementär zu cNkx5-1 auf den kaudolateralen Abschnitt der Ohrplakode beschränkt (Abb. 6 I und M). Wie cNkx5-1 und SOHo wird auch Pax2 im Hühnchen bereits früh in der Innenohrentwicklung, im Plakodenstadium,

aktiviert (Abb. 6 Q). Im Gegensatz zu cNkx5-1 und SOHo zeigt die frühe Pax2-Expression in der Ohrplakode jedoch keine rostrokale Beschränkung und ist entlang der gesamten Länge der Plakode nachweisbar. Lateral dehnt sich die Pax2-Expression über das Plakodenektoderm hinaus ins Oberflächenektoderm aus (schwarze Pfeilspitze in Abb. 6 Q). Das Hühnchen BMP4-Gen wird im Ohrplakodenstadium (H.H.-Stadium 10) noch nicht im Plakodenepithel selbst, jedoch in den Rhombomeren 3 und 5 des benachbarten Hinterhirns exprimiert. Erst mit der Invagination der Ohrplakode (H.H.-Stadium 11) wird BMP4 dann im medialen und kaudalen Abschnitt der entstehenden Ohrgrube aktiviert (ohne Abb., Wu et al., 1996). Während der Invaginierung der Ohrplakode verändert sich die Transkriptverteilung von cNkx5-1 (Abb. 6 B, C und F) und SOHo (Abb. 6 J, N, K und O) nur unwesentlich: cNkx5-1-Transkripte bleiben auf einen rostromedialen, SOHo-Transkripte auf einen kaudolateralen Abschnitt der Ohrgrube beschränkt. Durch verlängerte Farbreaktion konnte im späten Ohrgrubenstadium ein zusätzlicher, schwach Nkx5-1-positiver Fokus am posterioren Pol der Ohrgrube sichtbar gemacht werden (schwarze Pfeilspitze in Abb. 6 C). Erst mit dem Zusammenschluß der dorsalen Ränder der Ohrgrube zum Ohrvesikel gehen Nkx5-1-Transkripte auch auf die dorsolaterale Wand des Ohrvesikels über (Abb. 6 G) und kurz darauf in der medialen Vesikelwand ganz verloren. Dafür weitet sich die cNkx5-1-Domäne nun weiter nach posterior aus und erstreckt sich an E3,5 entlang der gesamten rostrokalen Achse des Ohrvesikels (Abb. 6 D und H). Zu diesem Stadium ist annähernd die gesamte kaudolaterale Hälfte des Ohrvesikels positiv für SOHo (Abb. 6 L und P), während cNkx5-1-Transkripte auf einen überlappenden, aber deutlich schmaleren dorsolateralen Abschnitt des Epithels beschränkt sind (Abb. 6 H). Im gleichen Zeitraum werden Pax2-Transkripte auf die dorsomediale Wand der invaginierenden Plakode begrenzt (Abb. 6 R) und sind im Ohrvesikel an E3,5 auf ein dorsomediales Kompartiment beschränkt (Abb. 6 S und T). Dieses Muster weicht von der Pax2-Expression in der Maus ab, wo die Transkripte in vergleichbaren Stadien in der ventromedialen Vesikelwand lokalisiert sind (Nornes et al., 1990; Rinkwitz-Brandt et al., 1995 und 1996). Die BMP4-Expression konzentriert sich bald nach der Ausbildung des geschlossenen Ohrvesikels (H.H.-Stadium 16-17) auf zwei Foci am rostralen und kaudalen Pol des Ohrvesikels. Diese beiden initialen Foci bleiben über eine längere Phase der weiteren Entwicklung des Ohrvesikels in der gleichen relativen Position erhalten. Sie entsprechen den Bereichen, aus denen sich später die Sinnesepithelien des anterioren und des posterioren Bogengangs (*Cristae ampullaris*) herausbilden (Romanoff, 1960; Von Bartheld et al., 1991). Später neu hinzukommende BMP4-exprimierende Bereiche im Ohrvesikel konnten jeweils als Anlage der übrigen Sinnesorgane des Hühnchenohrs identifiziert werden (Wu et al., 1996). BMP4 stellt damit den frühesten bislang bekannten Marker für alle Sinnesepithelien des Innenohrs dar.

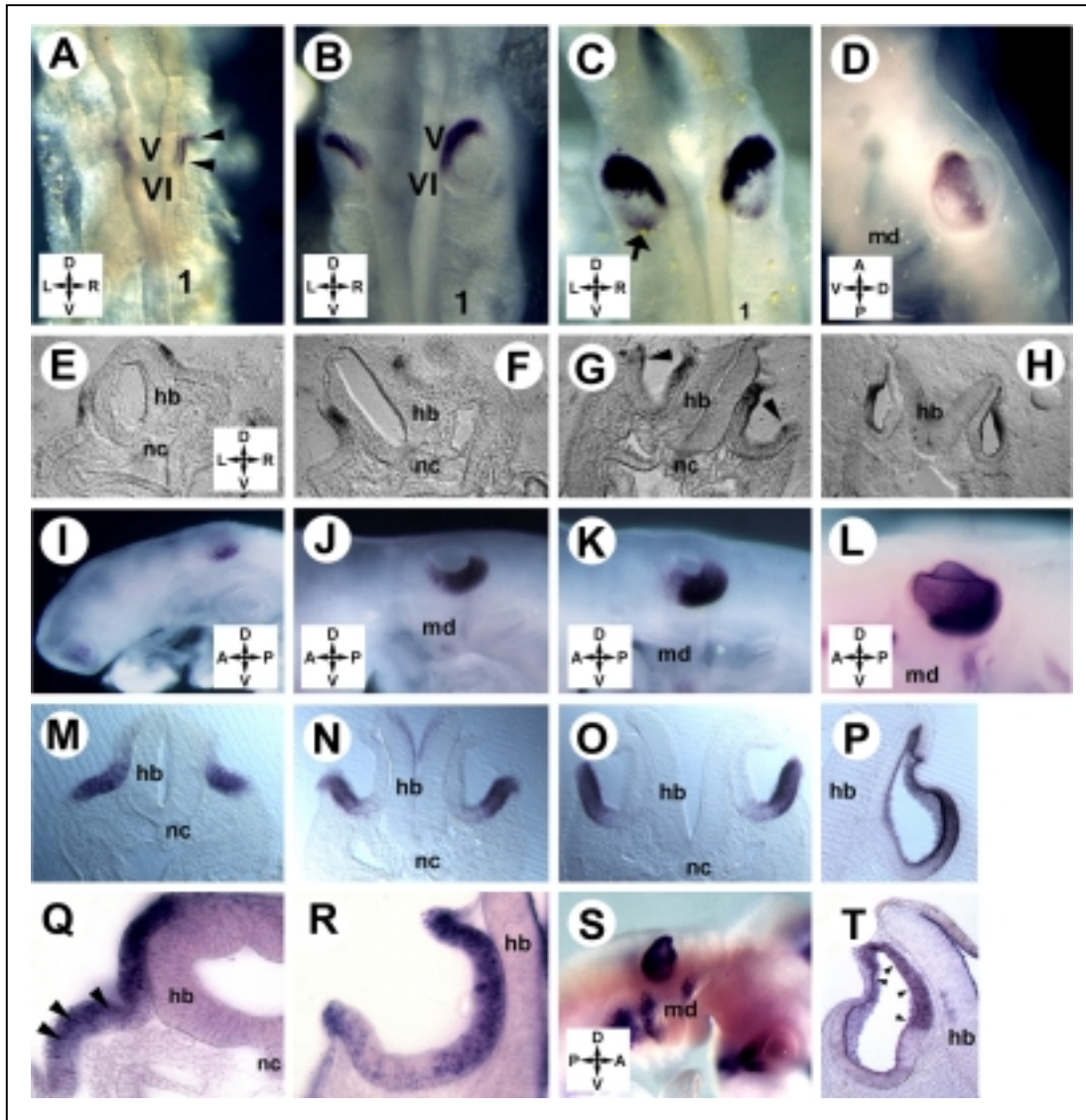


Abbildung 6: Vergleich der Expression von cNkx5-1 (A-H), SOHo (I-P) und Pax2 (Q-T) in der frühen Innenohranlage des Hühnchens, im Ohrplakoden-, Ohrgruben- und Ohrvesikelstadium. Gezeigt sind dorsale (A-C) oder laterale (D, I-L und S) Ansichten der Embryonen und korrespondierende Transversalschnitte durch die Ohrregion (E-H, M-R und T). Die Orientierung der Embryonen wird jeweils durch eingefügte Pfeildiagramme verdeutlicht. Alle Transversalschnitte sind wie in E orientiert. (A-H) Expression des cNkx5-1-Gens: (A) H.H.-Stadium 10 Embryo. Die Pfeilspitzen verdeutlichen die Beschränkung der cNkx5-1-Transkripte auf den rostralen Abschnitt der Ohrplakode lateral von Rhombomer V. (E) Transversalschnitt durch den anterioren Abschnitt der Ohrplakode des in A gezeigten Embryos. Die Beschränkung der Transkripte auf den medialen Anteil der Plakode ist deutlich erkennbar. (B, C) H.H.-Stadium 12+ Embryonen; der in C gezeigte Embryo ist intensiver gefärbt als der in B. Der Pfeil weist auf einen schwachen cNkx5-1-Expressionsfokus am kaudalen Ende der Ohrgrube hin. (F) Transversalschnitt durch die anteriore Ohrgrube des in B gezeigten Embryos. (G) Transversalschnitt durch die annähernd geschlossene Ohrgrube eines H.H.-Stadium 14 Embryos. Die Pfeilspitzen markieren erste cNkx5-1-positive Bereiche auf der dorsolateralen Seite des Epithels. (D) H.H.-Stadium 17; cNkx5-1-Transkripte erstrecken sich entlang der gesamten rostrokaudalen Achse des Vesikels. (H) Transversalschnitt durch die Ohrvesikel des in D gezeigten Embryos. (I-P) Expression des SOHo-Gens: (I) H.H.-Stadium 10 Embryo. (M) Transversalschnitt durch den posterioren Abschnitt der Ohrplakode des in I gezeigten Embryos. Die Beschränkung der Transkripte auf den lateralen

Anteil der Plakode ist deutlich erkennbar. (J, N) H.H.-Stadium 13 Embryo und (K, O) H.H.-Stadium 14 Embryo mit entsprechenden Transversalschnitten durch den posterioren Bereich der Ohrgrube. (L, P) H.H.-Stadium 17 Embryo mit Transversalschnitt. Die SOHo-Domäne umfaßt die gesamte laterale Vesikelhälfte.

(Q-T) Expression des Pax2-Gens: (Q) Transversaler Vibratomschnitt durch die Ohrplakode eines H.H.-Stadium 10 Embryos. Die Pfeilspitzen weisen darauf hin, daß die Pax2-Expression sich lateral über die Ohrplakode hinaus bis ins Oberflächenektoderm erstreckt. (R) Transversaler Vibratomschnitt durch die Ohrgrube eines H.H.-Stadium 12 Embryos. Pax2-Transkripte konzentrieren sich auf die laterale Hälfte der Ohrgrube. (S, T) H.H.-Stadium 17 Embryo mit korrespondierendem Transversalschnitt durch das Ohrvesikel. Pax2-Transkripte beschränken sich auf ein dorsomediales Kompartiment des Vesikels. Der in S gezeigte „whole mount“-Embryo verdeutlicht weitere prominente Pax2-Expressionsdomänen im Epithel der Kiemenbögen und im Auge. Abkürzungen: 1: erster Somit; V: fünftes Rhombomer; VI: sechstes Rhombomer; A: anterior; D: dorsal; hb: Hinterhirn; L: links; md: Mandibularbogen; nc: Notochord; P: posterior; R: rechts; V: ventral.

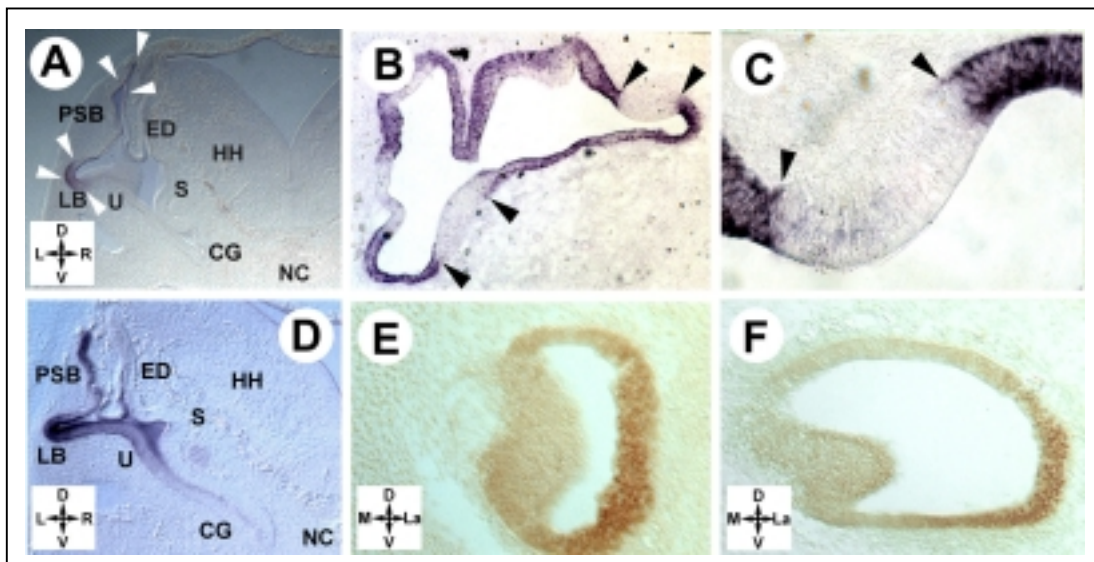


Abbildung 7: Expression von cNkx5-1, SOHo und Pax2 während der Morphogenese der Innenohrkompartimente. (A, D) Transversalschnitte zur Veranschaulichung der Transkriptverteilung für cNkx5-1 (A) und SOHo (D) an E5,5. Die cNkx5-1-Domänen in den Primordien der Bogengänge (weiße Pfeilspitzen) sind vollständig in der breiteren SOHo-Domäne enthalten. (B, C) cNkx5-1-Expression an E9 in einer Übersicht (B) und einer Ausschnittsvergrößerung (C) eines Schnitts durch den vestibulären Bereich des Labyrinths. Schwarze Pfeilspitzen markieren die Grenzen zwischen cNkx5-1-exprimierenden, nichtsensorischen Epithelien und cNkx5-1-freien Sinnesepithelien. (E, F) Lokalisierung des Pax2-Proteins in der lateralen Wand des cochleären Gangs an E7 (E) und E9 (F). Abkürzungen: A: anterior; CG: cochleärer Gang; D: dorsal; ED: Endolymphatischer Gang; HH: Hinterhirn; L: links; La: lateral; LB: lateraler Bogengang; NC: Notochord; P: posterior; PSB: Primordium des posterioren und superioren Bogengangs; R: rechts; S: Sacculus; U: Utriculus; V: ventral.

Mit beginnender Kompartimentierung des Innenohrs wird die Expression von cNkx5-1 und SOHo auf vestibuläre, die von Pax2 auf auditive Strukturen begrenzt (Abb. 7). Die Expression von cNkx5-1 und SOHo an Embryonaltag 5,5 wurde durch „whole mount“ *in situ* Hybridisierung untersucht. Die in Abbildung 7 A und D gezeigten Transversalschnitte verdeutlichen die

überlappende Expression von cNkx5-1 (Abb. 7 A) und SOHo (Abb. 7 D) in den Anlagen der Bogengänge. Wie in früheren Stadien ist der cNkx5-1-positive Bereich vollständig in der breiteren SOHo-Domäne enthalten. Das cNkx5-1-Muster an E7 und E9 wurde durch Hybridisierung ausgewählter Gefrierschnitte bestimmt. Wie in der Maus findet man cNkx5-1-Transkripte auf nichtsensorische Epithelien des vestibulären Systems beschränkt, während alle Sinnesepithelien frei von cNkx5-1-Expression sind (Abb. 7 B und C).

Die Verteilung des Hühnchen Pax2-Proteins an E7 und E9 wurde durch Anfärbung von Gefrierschnitten mit einem kommerziell erhältlichen, polyklonalen Pax2-Antikörper (Fa. Zymed) sichtbar gemacht. Wie in der Maus geht die Pax2-Aktivität in späteren Entwicklungsstadien auf das ventromediale Epithelium des Innenohrs über und markiert den auswachsenden cochleären Gang (Abb. 7 E und F).

3.2 Transplantation von Ohrektoderm an ektopische Positionen von Wirtsembryonen

Die frühe cNkx5-1-Expressionsdomäne ist dem Neuroepithelium des Hinterhirns direkt benachbart. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob Aktivierung und/oder Aufrechterhaltung der cNkx5-1-Expression von lokalen Signalen aus dem Hinterhirn abhängig sind. Dazu wurden zunächst Ohrplakoden von Spenderembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien an verschiedene Positionen entlang der Neuralachse gleichaltriger Wirtsembryonen oder in die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen transplantiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die operierten Embryonen auf das Vorhandensein ektopischer Ohrvesikel, deren Morphologie und die Aktivität von cNkx5-1, Pax2, SOHo, BMP4 und BMP7 untersucht.

3.2.1 Aspekte der Innenohrmorphogenese können in ektopischen Positionen entlang der Neuralachse ablaufen.

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit Aspekte der Innenohrmorphogenese nachvollzogen werden können, wenn frühe Ohrplakoden an ektopische Positionen in einem Wirtsembryo transplantiert werden. Dazu wurden, wie in den Abbildungen 8 und 9 skizziert, Ohrplakoden entlang der Neuralachse nach anterior, ins rostrale Hinterhirn oder Mittelhirn und nach posterior, auf die Höhe der Somiten 3/4 isochroner Wirtsembryonen transplantiert. Zudem wurde, wie Abbildung 10 zeigt, Innenohrektoderm verschiedener Entwicklungsstadien in die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen implantiert. Die operierten Embryonen wurden in der Regel für zwei Tage (40-44 Stunden), einige Embryonen mit Transplantaten im rostralen Hinterhirn jedoch auch für vier

Tage *in ovo* weiterinkubiert und dann zunächst im Hinblick auf folgende morphologische Eigenschaften charakterisiert: die Ausbildung eines geschlossenen Ohrvesikels, die Größe dieses ektopischen Vesikels sowie die Entwicklung eines Primordiums für den endolymphatischen Gang. Die Ergebnisse dieser Operationen werden in Tabelle 1 zusammengefaßt und nachfolgend im Detail geschildert.

3.2.1.1 Transplantationen ins rostrale Hinterhirn

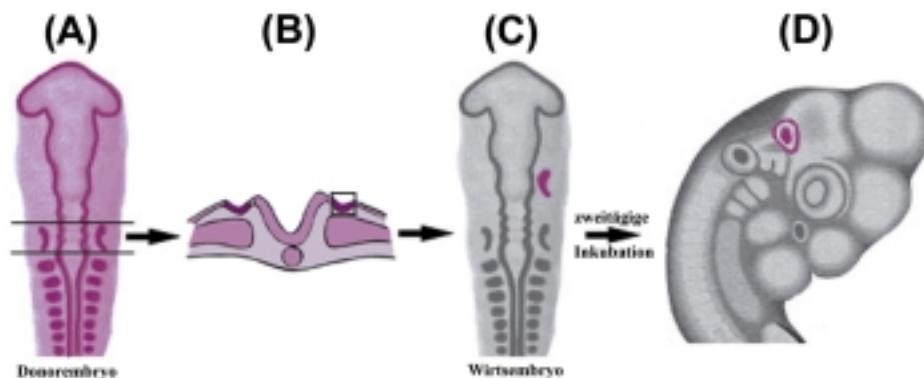


Abbildung 8: Skizze zur Veranschaulichung der Transplantationsexperimente ins rostrale Hinterhirn. (A) Aus Spenderembryonen der H.H.-Entwicklungsstadien 8-9 bzw. 10-12 wurden auf Höhe der Rhombomere 5 und 6 transversale Körperscheiben, die die gesamte Ohrplakode enthielten, entnommen. (B) Die Plakoden wurden in Dispaselösung aus dem umliegenden Gewebe herausgelöst und (C) in zufälliger Orientierung *in ovo* ins rostrale Hinterhirn oder Mittelhirn isochroner Wirtsembryonen inseriert. (D) Nach zweitägiger Inkubation wurden die Wirtsembryonen bezüglich der Entwicklung ektopischer Ohrvesikel und der Expression verschiedener innenohrspezifischer Gene analysiert.

Die Transplantation von Ohrplakoden in rostrale Positionen, auf die Höhe der Rhombomere 1/2 oder ins Mittelhirn, führte in Abhängigkeit vom Alter des Spenderembryos zu unterschiedlichen Resultaten. Ohrplakoden von Spenderembryonen vor dem 10 Somitenstadium (H.H.-Stadium 8-9) entwickelten sich in der ektopischen Position in etwa zwei Dritteln der Fälle (16/25) zu geschlossenen Ohrvesikeln weiter. Diese blieben jedoch immer kleiner als die endogenen Ohrvesikel und zeigten keine Anzeichen weiterreichender Innenohrmorphogenese wie das Auswachsen eines endolymphatischen Gangs.

Dahingegen entwickelten sich annähernd alle (49/51) erfolgreich nach weiter rostral transferierten Ohrplakoden von älteren Spenderembryonen im H.H.-Stadium 10-12 zu geschlossenen Ohrvesikeln weiter, die teilweise die gleiche Größe wie die endogenen Vesikel erreichten und häufig (30/51) erste Anzeichen einer fortschreitenden Morphogenese wie die Bildung eines Primordiums für den endolymphatischen Gangs zeigten. Trotzdem führte eine auf vier Tage verlängerte Inkubation in keinem von insgesamt elf operierten Embryonen zu einer normalen Morphogenese der ektopischen Vesikel. Statt dessen verblieben die ektopischen Vesikel in ihrem

weitgehend undifferenzierten Zustand, verloren die Aktivität der untersuchten Markergene (Abschnitt 3.2.2.1) und bildeten sich schließlich zurück.

3.2.1.2 Transplantationen auf Höhe der Somiten 3/4

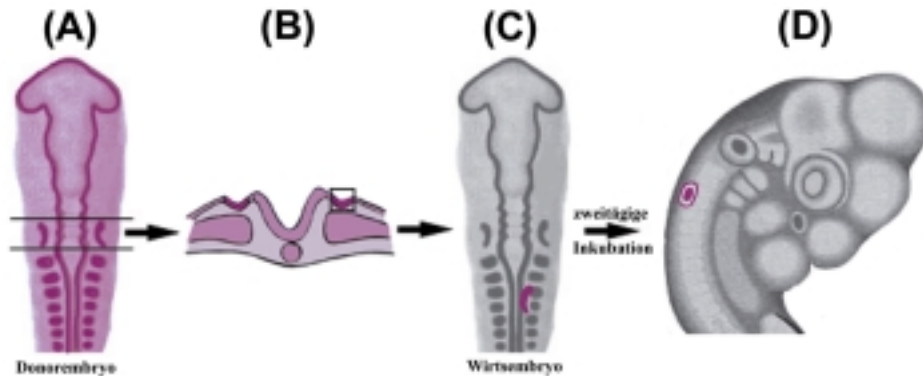


Abbildung 9: Skizze zur Veranschaulichung der Transplantationsexperimente von Ohrplakodenektoderm auf die Höhe der Somiten 3/4. (A) Aus Spenderembryonen der H.H.-Entwicklungsstadien 8-9 bzw. 10-12 wurden auf Höhe der Rhombomere 5 und 6 transversale Körperscheiben, die die gesamte Ohrplakode enthielten, entnommen. (B) Die Plakoden wurden in Dispaselösung aus dem umliegenden Gewebe herausgelöst und (C) in zufälliger Orientierung *in ovo* auf der Höhe der Somiten 3/4 zwischen Neuralrohr und somitischem Mesoderm isochroner Wirtsembryonen inseriert. (D) Nach zweitägiger Inkubation wurden die Wirtsembryonen bezüglich der Entwicklung ektopischer Ohrvesikel und deren Expression verschiedener innenohrspezifischer Gene analysiert.

Weiter posterior entlang der Neuralachse, auf die Höhe der Somiten 3/4 platzierte Ohrplakoden entwickelten sich hingegen nur dann zum Ohrvesikel weiter, wenn die Plakode nach dem 10 Somitenstadium entnommen wurde. Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, entwickelte sich in dieser Position keine von 15 im 6-9 Somitenstadium (H.H.-Stadium 8-9) transplantierten Ohrplakoden zum geschlossenen Vesikel weiter, während sich 22 von 27 der im 10-12 Somitenstadium transplantierten Ohrplakoden nach zweitägiger Inkubation zum Vesikel geschlossen hatten.

3.2.1.3 Transplantationen in die Flügelknospen

In die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen (H.H.-Stadium 18–21) inserierte Ohrplakoden zeigten ein anderes Verhalten als Transplantate entlang der Neuralachse: Vor dem 18 Somitenstadium (H.H.-Stadium 13) transplantierte Ohrplakoden oder -gruben entwickelten sich in den Flügelknospen nie (0/11) zum Vesikel weiter. Im H.H.-Stadium 13-14 transplantierte Ohrgruben zeigten keinerlei Größenwachstum, schlossen sich aber in wenigen Fällen (2/10) zu kleinen Ohrvesikeln. Im H.H.-Stadium 18-19 transplantierte Ohrvesikel behielten ihre Morphologie

(5/5) bei, zeigten in den Flügelknospen jedoch weder Wachstum noch Anzeichen fortschreitender Morphogenese wie das Auswachsen eines Primordiums für den endolymphatischen Gang.

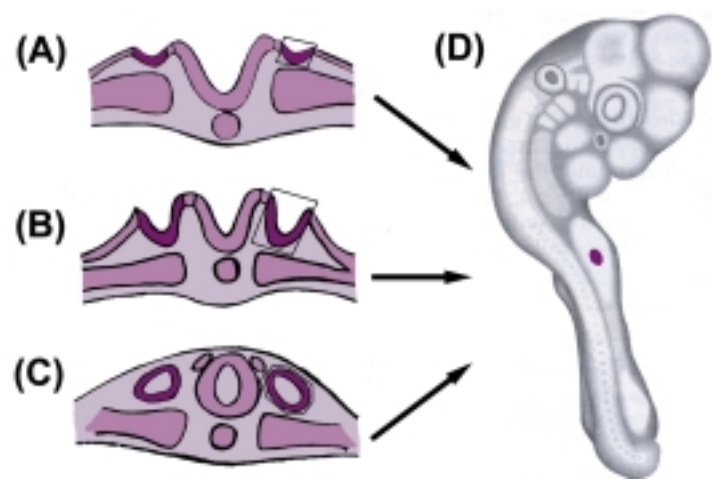


Abbildung 10: Skizze zur Veranschaulichung der Transplantationsexperimente von Innenohrektoderm aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien in die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen. Aus Spenderembryonen der H.H.-Entwicklungsstadien 8-10 (A), 13-14 (B) oder 18-19 (C) wurden auf Höhe der Rhombomere 5 und 6 transversale Körperscheiben, die das gesamte Innenohrepithelium enthielten, entnommen. Das Innenohrektoderm wurde in Dispaselösung aus dem umliegenden Gewebe herausgelöst und (D) in zufälliger Orientierung *in ovo* ins Mesenchym der Flügelknospen von Wirtsembryonen im H.H.-Stadium 18-19 inseriert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Wirtsembryonen bezüglich der Entwicklung ektopischer Ohrvesikel in den Flügelknospen und deren Expression des *cNkx5-1*-Gens analysiert.

Transplan- tationsort	Alter der Do- norembryonen (H.H.-Stadium)	Alter Wrts- embryonen (H.H.Stadiu m)	Anzahl	Ektopische Vesikelbildung	Bildung ED- Primordium
Neuralachse (anterior)	8 - 9 ⁺ 10 - 12	9 - 10 9 - 12	25 51	16 (64%) 49 (96%)	0 30 (59%)
Neuralachse (posterior)	8 - 9 ⁺ 10 - 12	9 - 10 9 - 12	15 27	0 22 (81%)	0 n.b.
Flügelknospen	8 - 12 13 - 14 18 - 19	18 - 21 18 - 21 18 - 21	11 10 5	0 2 (20%) 5 (100%)	0 0 0

Tabelle 1: Entwicklung transplanterter Ohrplakoden in Abhängigkeit vom Alter der Plakoden und dem Transplantationsort im Wirtsembryo. ED: Endolymphatischer Dukt; H.H.: Hamburger-Hamilton; n.b.: nicht bestimmt.

3.2.2 cNkx5-1, SOHo, Pax2, BMP4 und BMP7 zeigen eine unterschiedliche Abhängigkeit von lokalen Signalen während der Ausbildung des Ohrvesikels.

Die Innenohrmorphogenese wird durch ein komplexes Netzwerk genetischer Interaktionen gesteuert. Schon lange bevor sich morphologisch sichtbare Kompartimente aus dem homogen erscheinenden Ohrethelium herausbilden, werden sie durch die Aktivität regulativer Gene auf ihr späteres Schicksal festgelegt. Man sollte annehmen, daß Abweichungen von einer normalen Innenohrmorphogenese in den ektopisch platzierten Ohrplakoden durch Veränderungen im Expressionsmuster solcher Regionalisierungsgene widergespiegelt oder sogar vorweggenommen werden. Daher wurden die operierten Embryonen über eine rein morphologische Analyse hinaus auf die Expression von fünf Genen, cNkx5-1, SOHo, Pax2, BMP4 und BMP7, die an der Regulation verschiedener Aspekte der Ohrentwicklung beteiligt sind, untersucht. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigt Tabelle 2. Dabei werden als N_{positiv} alle Embryonen mit einem eindeutigen Hybridisierungssignal im ektopischen Vesikel zusammengefaßt, unabhängig von der Signalintensität und der Verteilung der Transkripte. Beide Aspekte werden in den folgenden Abschnitten 3.2.2.1 bis 3.2.2.5 detailliert im Text ausgeführt. Das unterschiedliche Verhalten der Gene in den ektopisch formierten Ohrvesikeln zeigte, daß verschiedene Aspekte der frühen Ohrentwicklung in unterschiedlichem Maße von lokalen Signalen abhängig sind und zu verschiedenen Zeitpunkten, unabhängig voneinander festgelegt werden.

	Hinterhirn / Mittelhirn				Posteriore Neuralachse			
	H.H.-Stadium 8 - 9 ⁺		H.H.-Stadium 10 - 12		H.H.-Stadium 8 - 9 ⁺		H.H.-Stadium 10 - 12	
	N_{gesamt}	N_{positiv}	N_{gesamt}	N_{positiv}	N_{gesamt}	N_{positiv}	N_{gesamt}	N_{positiv}
cNkx5-1	16	7	14	14	15	0	11	11
Pax2	n.a.	n.a.	30	25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
BMP4	n.a.	n.a.	18	18	n.a.	n.a.	8	8
SOHo	n.a.	n.a.	15	15	n.a.	n.a.	8	8
Bmp7	n.a.	n.a.	12	12	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Tabelle 2: Genaktivität von cNkx5-1, Pax2, BMP4, SOHo und BMP7 in transplantierten Ohrplakoden in Abhängigkeit vom Alter der Plakoden und dem Transplantationsort im Wirtsembryo. Abkürzungen: HH, Hamburger-Hamilton-Stadium; Abkürzungen: N_{gesamt} : Anzahl der untersuchten Embryonen; N_{positiv} : Anzahl der Embryonen mit Markergenexpression im ektopischen Vesikel; n.a.: nicht analysiert.

3.2.2.1 In Ohrplakoden im rostralen Hinterhirn und Mittelhirn kann cNkx5-1 aktiviert werden und sein endogenes Muster rekonstituieren.

Das Verhalten des cNkx5-1-Gens in ektopisch gebildeten Ohrvesikeln hing entscheidend von zwei Faktoren ab: Zunächst vom Alter der Ohrplakode zum Zeitpunkt der Transplantation und zum anderen davon, wie weit der Transplantationsort von der endogenen Ohranlage entfernt war (Tabelle 2). Das cNkx5-1-Gen wird im 10 Somitenstadium im rostralen Abschnitt der Ohrplakode aktiviert. Wurden Ohrplakoden vor dem 10 Somitenstadium in ektopische Positionen versetzt, so konnte cNkx5-1-Aktivität im transplantierten Epithelium nur dann nachgewiesen werden, wenn die Operation in weiter rostral gelegene Abschnitte des Hinterhirns oder Mittelhirns erfolgte (Tabelle 2). Nach Transplantation auf die Höhe der Rhombomere 1/2 konnten in der Hälfte (5/10) der resultierenden Ohrvesikel cNkx5-1-Transkripte nachgewiesen werden, nach Transplantation ins Mittelhirn in zwei von sechs Fällen (Tabelle 2 und Abbildung 11).

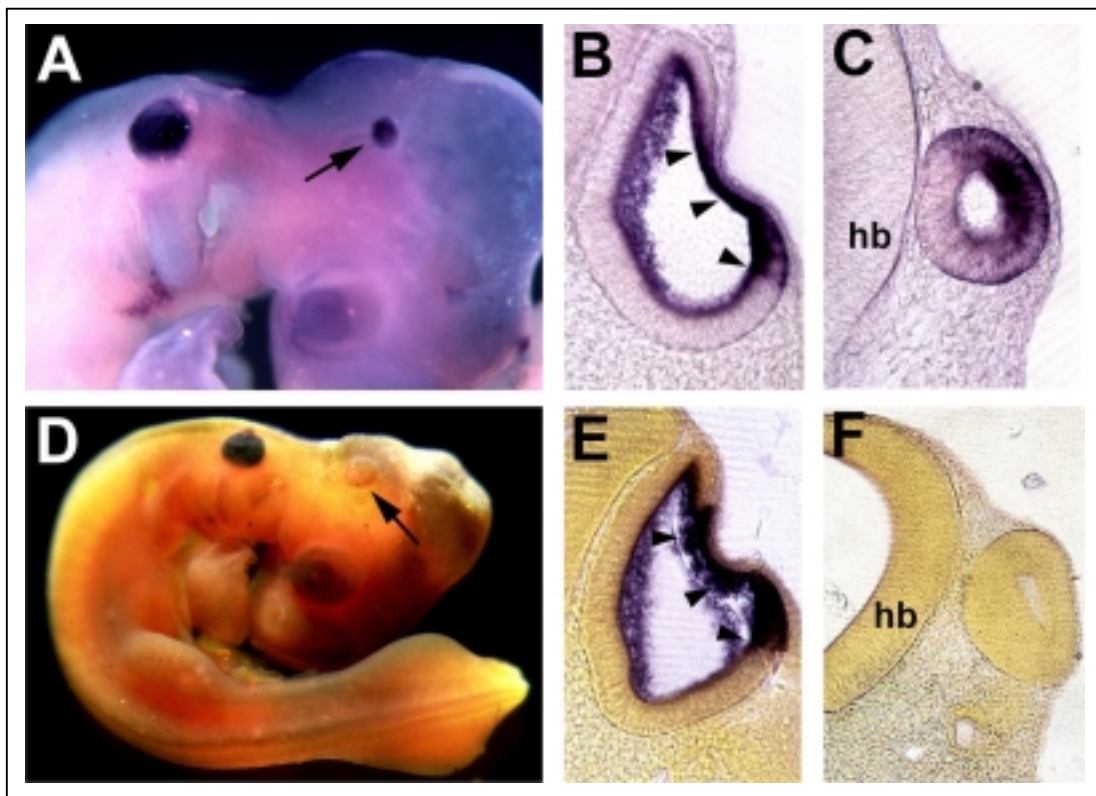


Abbildung 11: cNkx5-1-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden vor H.H.-Stadium 10 nach weiter rostral transplantiert wurden. Gezeigt ist je ein Embryo, positiv (A-C) und negativ (D-F) für cNkx5-1-Expression im ektopisch geformten Ohrvesikel, als „whole mount“ (A, D) und mit den entsprechenden Transversalschnitten durch die endogenen (B, E) und ektopischen (C, F) Ohrvesikel. In cNkx5-1-positiven ektopischen Vesikeln (C) war die Expressionsdomäne ähnlich wie in der endogenen Situation (B, E) auf die laterale Hälfte des Epitheliums beschränkt. Die Pfeile in A und D zeigen auf die ektopischen Ohrvesikel, Pfeilspitzen markieren Größe und Lage der cNkx5-1-Expressionsdomänen. Abkürzungen: hb: Hinterhirn.

Abbildung 11 A-C zeigt exemplarisch einen Embryo, bei dem sich eine im 8 Somitenstadium ins rostrale Hinterhirn transplantierte Ohrplakode zum geschlossenen Ohrvesikel weiterentwickeln konnte und cNkx5-1 Genaktivität zeigte. Ein Vergleich der transversalen Schnitte durch endogenes und ektopisches Ohrvesikel zeigt, daß sowohl die Signalintensität als auch die Lokalisierung der cNkx5-1-Transkripte auf der lateralen, der Neuralachse abgewandten Vesikelwand in der ektopischen Position erhalten blieben. Abbildung 11 D-F zeigt dagegen einen Embryo, bei dem sich eine im 8 Somitenstadium ins rostrale Hinterhirn transplantierte Plakode zwar zum geschlossenen Ohrvesikel weiterentwickeln konnte, die cNkx5-1-Transkription jedoch nicht aktiviert wurde. Auffällig ist außerdem, daß die dorsale Ausbuchtung des auswachsenden endolymphatischen Gangs, die in den endogenen Ohrvesikeln klar zu erkennen ist (Abb. 11 B und E), in allen Ohrvesikeln fehlte, die aus vor H.H.-Stadium 10 transplantierten Ohrplakoden gebildet wurden (Abb. 11 C und F).

Erfolgte die Transplantation hingegen zu späteren Stadien (H.H.-Stadium 10-12), d.h. nach der Aktivierung von Nkx5-1, wurde die Expression in allen ektopisch in der rostralen Hinterhirn- und Mittelhirnregion gebildeten Vesikeln aufrecht erhalten (Tabelle 2 und Abb. 12 A-F). Man sieht deutlich, daß in beiden ektopischen Positionen die Nkx5-1-Transkripte, genau wie in der endogenen Situation, stets auf die laterale, dem Neuroepithelium abgewandte Vesikelhälfte beschränkt blieben. Auch in ihrer Signalintensität entsprachen sie der endogenen Situation. Insgesamt war die cNkx5-1-Expressionsdomäne in den ektopischen Ohrvesikeln jedoch immer etwas breiter als in den endogenen Vesikeln und erstreckte sich über die gesamte laterale Vesikelhälfte (Abbildung 12 C und F) statt nur auf den dorsolateralen Anteil (Abbildung 12 B und E). Während die endogenen Ohrvesikel an ihrem dorsalen Pol bereits eine deutlich sichtbare Ausstülpung des endolymphatischen Gangs besaßen (Abbildung 12 B und E), waren die ektopischen Vesikel in 40% der untersuchten Embryonen annähernd sphärisch (Abbildung 12 F), wie es auch nach Transplantation der Plakoden vor dem 10 Somitenstadium beobachtet wurde. In 60% der Embryonen war die Anlage des endolymphatischen Gangs am dorsalen Vesikelpol hingegen auch in den ektopischen Vesikeln deutlich zu erkennen (Abbildung 12 C).

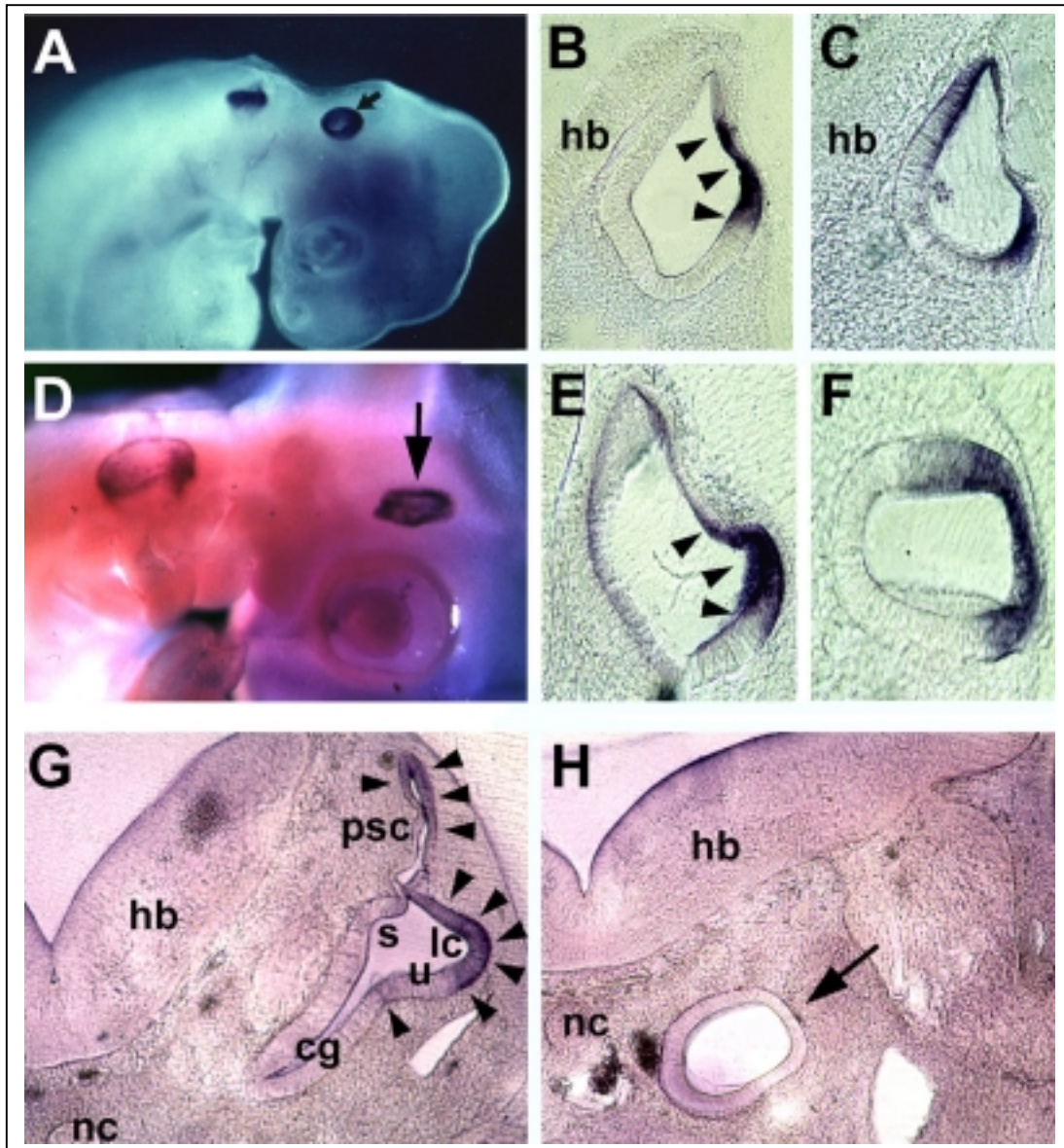


Abbildung 12: cNkx5-1-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden im H.H.-Stadium 10-12 nach weiter rostral transplantiert wurden. (A-C) Transplantation ins rostrale Hinterhirn und (D-F) Transplantation ins Mittelhirn nach zweitägiger Inkubation. Gezeigt sind jeweils laterale Ansichten der „whole mount“-Embryonen (A, D) sowie transversale Schnitten durch die endogenen (B, E) und ektopischen (C, F) Ohrvesikel. Auffällig ist die annähernd „korrekte“ Transkriptverteilung in den ektopischen Vesikeln. (G, H) Transversalschnitte von endogenem (G) und ektopischem (H) Ohrvesikel nach viertägiger Inkubation mit weitgehendem Verlust der cNkx5-1-Genaktivität im ektopischen Vesikel. Pfeile zeigen auf die ektopischen Ohrvesikel, Pfeilspitzen indizieren Größe und Lage der cNkx5-1-Expressionsdomänen im endogenen Vesikel. Abkürzungen: cg: cochleärer Gang; hb: Hinterhirn; nc: Notochord; lc: Ausstülpung des lateralen Bogengangs; psc: Primordium des superioren und posterioren Bogengangs; s: Sacculus; u: Utriculus.

Wurden die Embryonen nach der Operation für vier Tage weiter inkubiert, kam es zur Arretierung der Innenohrmorphogenese im Vesikelstadium und die cNkx5-1-Genaktivität in den ektopischen Vesikeln war drastisch reduziert. Die in Abbildung 12 G und H gezeigten transversalen Vibratomschnitte verdeutlichen, daß im endogenen Ohrvesikel bereits die Anlagen der Bogengänge

nach dorsal und lateral und die des cochleären Gangs nach ventromedial ausgebildet wurden und cNkx5-1-Transkripte auf Strukturen innerhalb des vestibulären Abschnitts beschränkt waren. Dahingegen war die cNkx5-1-Expressionsdomäne im ektopischen Vesikel diffus verbreitert und in ihrer Intensität deutlich reduziert.

3.2.2.2 Ektopische Ohrvesikel zeigen keine normale Regionalisierung der Pax2-Transkripte.

Um die Abhängigkeit der Pax2-Transkriptverteilung von lokalen Signalen zu untersuchen, wurden insgesamt 30 Transplantationen von Ohrplakoden im H.H.-Stadium 10-12 in weiter rostrale Positionen im Hinblick auf ihre Pax2-Expression analysiert. Die Pax2-Expression in diesen Vesikeln zeigte, wie in Abbildung 13 dargestellt und in Tabelle 2 zusammengefaßt, ein völlig anderes Verhalten als das cNkx5-1-Gen.

Gemessen an der Intensität der Pax2-Domäne in den ektopischen Vesikeln, konnten zwei Klassen von Ergebnissen unterschieden werden: In etwas mehr als der Hälfte der Vesikel (17/30) war das Niveau der Pax2-Expression vergleichbar mit den endogenen Ohrvesikeln desselben Embryos oder nur geringfügig schwächer. Beispiele solcher ektopischer Vesikel sind in Abbildung 13 C, F und H gezeigt. Die übrigen Vesikel (13/30) zeigten eine signifikant schwächere (8/30) oder keine (5/30) Pax2-Expression, auch wenn das endogene Vesikel normal angefärbt war (Abb. 13 E und I).

Ein weiterer, wichtiger Unterschied im Verhalten von cNkx5-1 und Pax2 betraf die Regionalisierung der Transkripte: Während das endogene cNkx5-1-Muster in den ektopischen Vesikeln weitgehend rekonstituiert wurde, war das für die Pax2-Transkripte nicht der Fall. Die ektopischen Ohrvesikel zeigten eine extrem variable Verteilung der Pax2-Transkripte und schalteten das Pax2-Gen häufig in der lateralen anstelle der medialen Vesikelwand (Abb. 13 C und G) oder sogar im gesamten Epithelium (Abb. 13 F) an. Diese Ergebnisse implizieren, daß die Regulation der Pax2-Transkriptmenge und -verteilung wesentlich sensibler gegenüber lokalen Signalen ist als die des cNkx5-1-Gens.

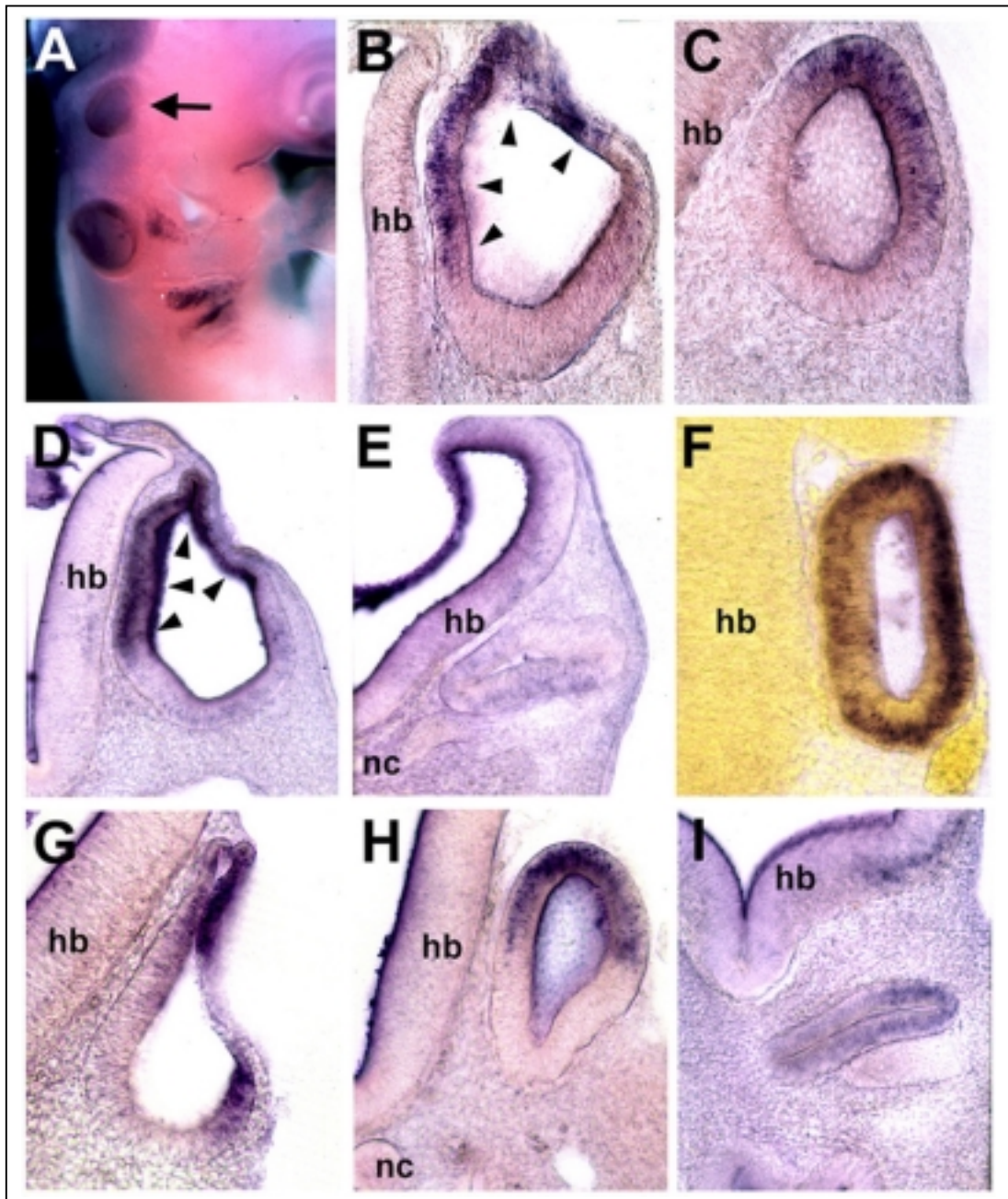


Abbildung 13: Pax2-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden in H.H.-Stadium 10-12 nach weiter rostral transplantiert wurden. Zwei verschiedene Klassen von Ergebnissen bezüglich der Pax2-Signallintensität werden beispielhaft in A-C und D-E dargestellt. (A) Laterale Ansicht eines Embryos mit vergleichbarer Transkriptmenge im endogenen und ektopischen Ohrvesikel, (B) Transversalschnitt durch das endogene Ohrvesikel und (C) Transversalschnitt durch das ektopische Ohrvesikel. Transversalschnitte durch endogenes (D) und ektopisches (E) Ohrvesikel eines anderen Embryos zeigten dagegen nur eine geringe ektopische Pax2-Expression. (F-I) Exemplarische Transversalschnitte durch weitere ektopische Ohrvesikel mit starker (F-H) bzw. schwacher (I) Pax2-Genaktivität. In keinem der ektopisch gebildeten Ohrvesikel wurde die Lage der endogenen Pax2-Expressionsdomäne aufrecht erhalten. Der Pfeil in A zeigt auf das ektopische Ohrvesikel im rostralen Abschnitt des Hinterhirns; Pfeilspitzen markieren Größe und Lage der endogenen Pax2-Expressionsdomäne im dorsalen und medialen Vesikelbereich. Abkürzungen: hb: Hinterhirn; nc: Notochord.

3.2.2.3 BMP4-Expression wird in ektopischen Vesikeln in zwei gegenüberliegenden Foci aufrecht erhalten.

BMP4 wird im Ohrvesikel, wie bereits beschrieben, zunächst in zwei diskreten Foci am rostralen und kaudalen Pol des Vesikels exprimiert (Abb. 14 A und B), die die Anlage der Sinnesepithelien des anterioren und posterioren Bogengangs darstellen. Um die Abhängigkeit der BMP4-Transkriptverteilung von lokalen Signalen zu untersuchen, wurden insgesamt 18 Transplantationen von Ohrplakoden im H.H.-Stadium 10-12 ins rostrale Hinterhirn oder Mittelhirn im Hinblick auf ihre BMP4-Expression analysiert. In allen ektopisch gebildeten Ohrvesikeln (18/18) konnten BMP4-Transkripte nachgewiesen werden (Tabelle 2). Abbildung 14 C-H zeigt drei operierte, BMP4-gefärbte Embryonen mit ektopischen Vesikeln im rostralen Hinterhirn und Vibratomschnitte durch deren ektopische Vesikel. Man sieht deutlich, daß die BMP4-Transkripte, ähnlich wie im endogenen Vesikel, auch in den ektopischen Vesikeln stets auf schmale, scharf begrenzte Foci beschränkt waren, die einander meistens gegenüber lagen. Dagegen blieb die Lage der BMP-positiven Foci in den ektopischen Vesikeln bezüglich der embryonalen Achsen nicht erhalten. Anstelle einer anterioren und einer posterioren BMP4-Domäne wurden in den ektopischen Vesikeln auch eine dorsale und eine ventrale Domäne (Abb. 14 C, D und E, F) oder schräg versetzte Domänen mit einem postero-dorso-medialem und einem antero-ventro-lateralem BMP4-Fokus (Abb. 14 G und H) gefunden.

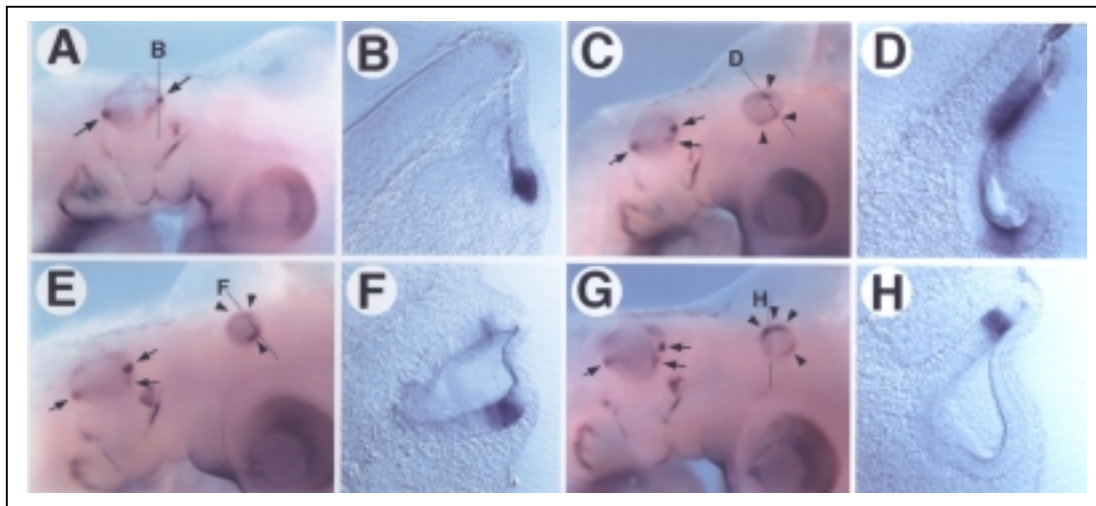


Abbildung 14: BMP4-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden in H.H.-Stadium 10-12 nach weiter rostral transplantiert wurden. (A, B) Nicht operierter Embryo. A zeigt eine laterale Ansicht des „whole mount“-Embryos, B einen Transversalschnitt durch den anterioren BMP4-Expressionsfokus. (C, D) (E, F) und (G, H) zeigen drei Beispiele für BMP4-Expression in ektopisch gebildeten Ohrvesikeln, jeweils mit einer lateralen Ansicht des operierten Embryos (C, E und G) und einem transversalen Schnitt durch sein ektopisches Ohrvesikel (D, F und H). Pfeile indizieren die Lage der eng begrenzten BMP4-positiven Foci im endogenen Ohrvesikel, Pfeilspitzen die ähnlich klar begrenzten BMP4-positiven Bereiche in den ektopisch gebildeten Ohrvesikeln. Die Lage der gezeigten Transversalschnitte wird in den „whole mount“-Darstellungen skizziert.

3.2.2.4 SOHo-Expression wird in ektopischen Vesikeln aktiviert bzw. aufrecht erhalten, die Transkripte jedoch nicht korrekt lokalisiert.

Als weiteres Markergen wurde das Homöoboxgen SOHo untersucht. Wie bereits beschrieben, wird SOHo im 11 Somitenstadium im kaudalen Abschnitt der Innenohrplakode aktiviert. In einigen Ohrplakoden, die im 10-12 Somitenstadium transplantiert wurden, war daher die SOHo-Expression bereits initiiert, in anderen noch nicht. In allen 15 analysierten Embryonen konnte SOHo-Aktivität in den ektopisch geformten Ohrvesikeln nachgewiesen werden (Tabelle 2 und Abb. 15). Die Expression des SOHo-Gens kann also in der gesamten Hinterhirn- und Mittelhirnregion sowohl initiiert als auch aufrecht erhalten werden. Auffällig ist, daß sich endogene und ektopische Ohrvesikel sowohl im Hinblick auf die Signalintensität als auch bezüglich der Transkriptverteilung unterscheiden. In einigen Embryonen wiesen endogenes und ektopisches Vesikel, wie in Abbildung 15 A-C gezeigt, ein ähnliches SOHo-Transkriptionsniveau auf. In anderen Embryonen war die Genaktivität in der ektopischen Struktur höher (Abb.15 D-F) oder geringer (nicht gezeigt) als im endogenen Vesikel. Die endogene SOHo-Expressionsdomäne umfaßt die laterale Vesikelhälfte, wohingegen in ektopischen Ohrvesikeln kein einheitliches Muster gefunden werden konnte. In allen untersuchten Embryonen war jedoch die ektopische SOHo-Domäne breiter als die endogene (Abb. 15 C), in einigen Fällen erstreckte sie sich sogar annähernd über das gesamte Epithelium (Abb. 15 F).

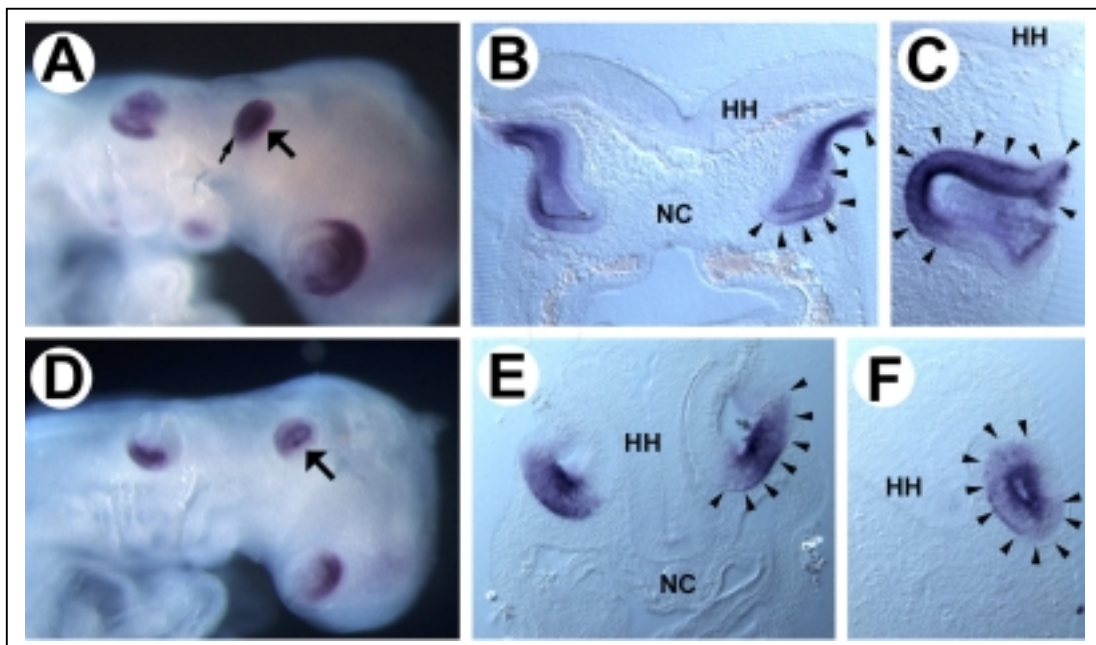


Abbildung 15: SOHo-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden im H.H.-Stadium 10-12 nach weiter rostral transplantiert wurden. (A, D) laterale Ansichten der Kopfregion von zwei operierten Embryonen. Die Pfeile zeigen auf die ektopischen Ohrvesikel. (B, E) Transversalschnitte durch die endogenen und (C, F) ektopischen Ohrvesikel der in A und D dargestellten Embryonen. Pfeilspitzen markieren Lage und Größe der

SOHo-Expressionsdomänen, die in den ektopischen Vesikeln nicht korrekt lokalisiert wurden. Abkürzungen: HH: Hinterhirn; NC: Notochord.

3.2.2.5 BMP7-Expression wird in ektopischen Vesikeln im rostralen Hinterhirn oder Mittelhirn aufrecht erhalten.

Die Expression des Signalmoleküls BMP7 im Innenohr des Hühnchens wurde detailliert beschrieben. BMP7-Transkripte können bereits im 8 Somitenstadium im medialen Abschnitt der erst kurz zuvor gebildeten Innenohrplakode nachgewiesen werden. Im Ohrvesikel ist BMP7 relativ breit exprimiert und umfaßt das gesamte Epithel bis auf einen kleinen anteromedialen und dorsolateralen Bereich (Wu et al., 1996; Oh et al., 1996). Um die Abhängigkeit der BMP7-Transkriptverteilung von lokalen Signalen zu untersuchen, wurden insgesamt 12 Transplantationen von Ohrplakoden im H.H.-Stadium 10-12 ins rostrale Hinterhirn oder Mittelhirn im Hinblick auf ihre BMP7-Expression analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und Abbildung 16 zusammengestellt.

In allen untersuchten Embryonen konnten BMP7-Transkripte in den ektopisch gebildeten Ohrvesikeln nachgewiesen werden. Aufgrund des breiten, dynamischen und komplexen BMP7-Expressionsmusters im endogenen Innenohrepithelium können jedoch leider keine Aussagen darüber gemacht werden, inwieweit das endogene Muster in den ektopischen Vesikeln rekonstituiert wurde.

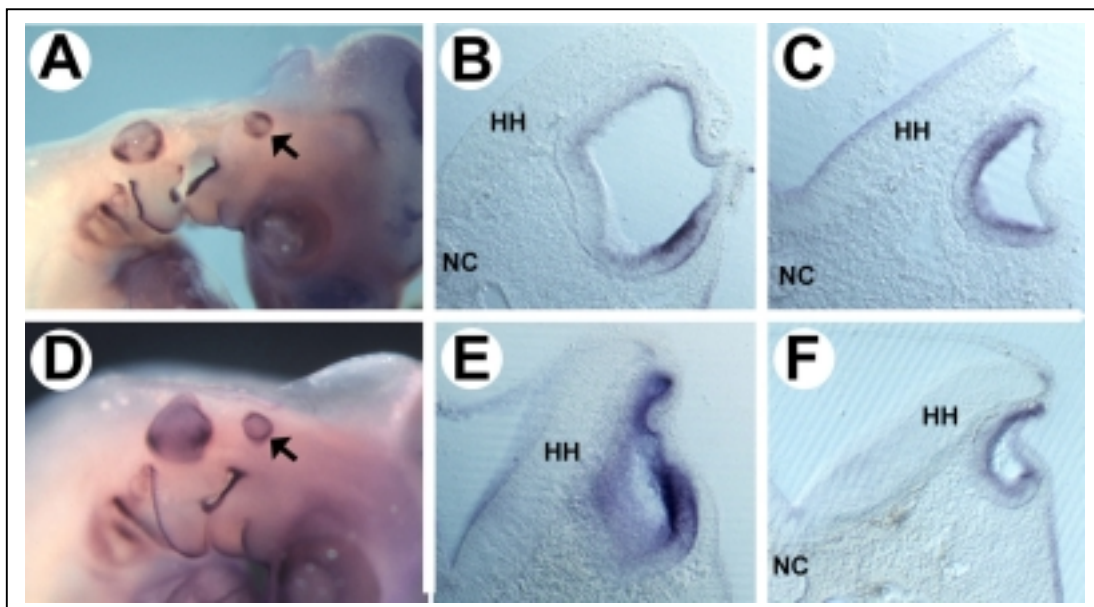


Abbildung 16: BMP7-Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden in H.H.-Stadium 10-12 nach weiter rostral transplantiert wurden. (A, D) laterale Ansicht der Kopfregion von zwei operierten Embryonen. Die Pfeile zeigen auf die ektopisch gebildeten Ohrvesikel. (B, E) Transversalschnitte durch die rechten, endogenen und (C, F) ektopischen Ohrvesikel der in A und D dargestellten Embryonen. Abkürzungen: HH: Hinterhirn; NC: Notochord.

3.2.3 Die Transkripte von cNkx5-1, BMP4 und SOHo werden in Ohrplakoden-Transplantaten nach posterior nicht korrekt lokalisiert.

Im Gegensatz zu den nach rostral verlagerten Transplantaten konnten sich weiter posterior, lateral der Somiten 3/4 plazierte Plakoden nur dann zum Ohrvesikel weiterentwickeln, wenn das Spendergewebe aus Embryonen mit mindestens 10 Somiten (H.H.-Stadium 10) isoliert wurde. Zur weiteren Charakterisierung wurden die operierten Embryonen durch „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen für die Markergene, cNkx5-1, SOHo und BMP4 untersucht und gezeigt, daß alle drei Markergene auch in den weiter posterior gebildeten Vesikeln exprimiert werden. Hybridisierungen mit allen drei Genen sind in Abbildung 17 zusammengestellt.

Bezüglich der Genaktivität in den ektopischen Vesikeln zeigte vor allem das cNkx5-1-Gen ein anderes Verhalten als nach der Transplantation in weiter rostrale Abschnitte des ZNS. Während die in weiter rostralen Positionen gebildeten ektopischen Vesikel das endogene cNkx5-1-Muster weitgehend rekonstituierten (Abb. 12 und 13), führte die Transplantation in weiter posteriore Positionen in den 11 untersuchten Embryonen nicht zu einem einheitlichen cNkx5-1-Muster. Auch im Hinblick auf die Signalintensität gab es zwischen den einzelnen, analysierten Embryonen deutliche Variationen. Zum einen wurden Embryonen mit ähnlicher cNkx5-1-Aktivität im endogenen und ektopischen Vesikel und einer Beschränkung der Transkripte auf einen Teil des Epithels gefunden (Abb. 17 A-C). Die gleiche Operation resultierte jedoch auch in Embryonen mit deutlich erhöhter oder deutlich verringerter Genaktivität in den ektopischen Vesikeln. In einigen ektopischen Vesikeln umfaßte die cNkx5-1-Domäne zudem annähernd das gesamte Epithelium (nicht gezeigt).

SOHo und BMP4 verhielten sich in weiter posterior, lateral des Neuralrohrs geformten Ohrvesikeln ähnlich wie in weiter anterioren Positionen. SOHo-Transkripte konnten in allen (8/8) analysierten Embryonen nachgewiesen werden, entsprachen jedoch weder bezüglich der Signalstärke noch im Hinblick auf ihre Verteilung der endogenen Situation (Abb. 17 D-F). Auch BMP4-Expression war in allen (8/8) auf Höhe der Somiten 3/4 gebildeten ektopischen Vesikeln nachweisbar und, ähnlich wie in der endogenen Situation, innerhalb des Epithels auf eng begrenzte Foci beschränkt (Abb. 17 G-I). Die Lage dieser BMP4-positiven Bereiche bezüglich der embryonalen Achsen war jedoch, genau wie nach Transplantation ins rostrale Hinterhirn oder Mittelhirn, zufällig.

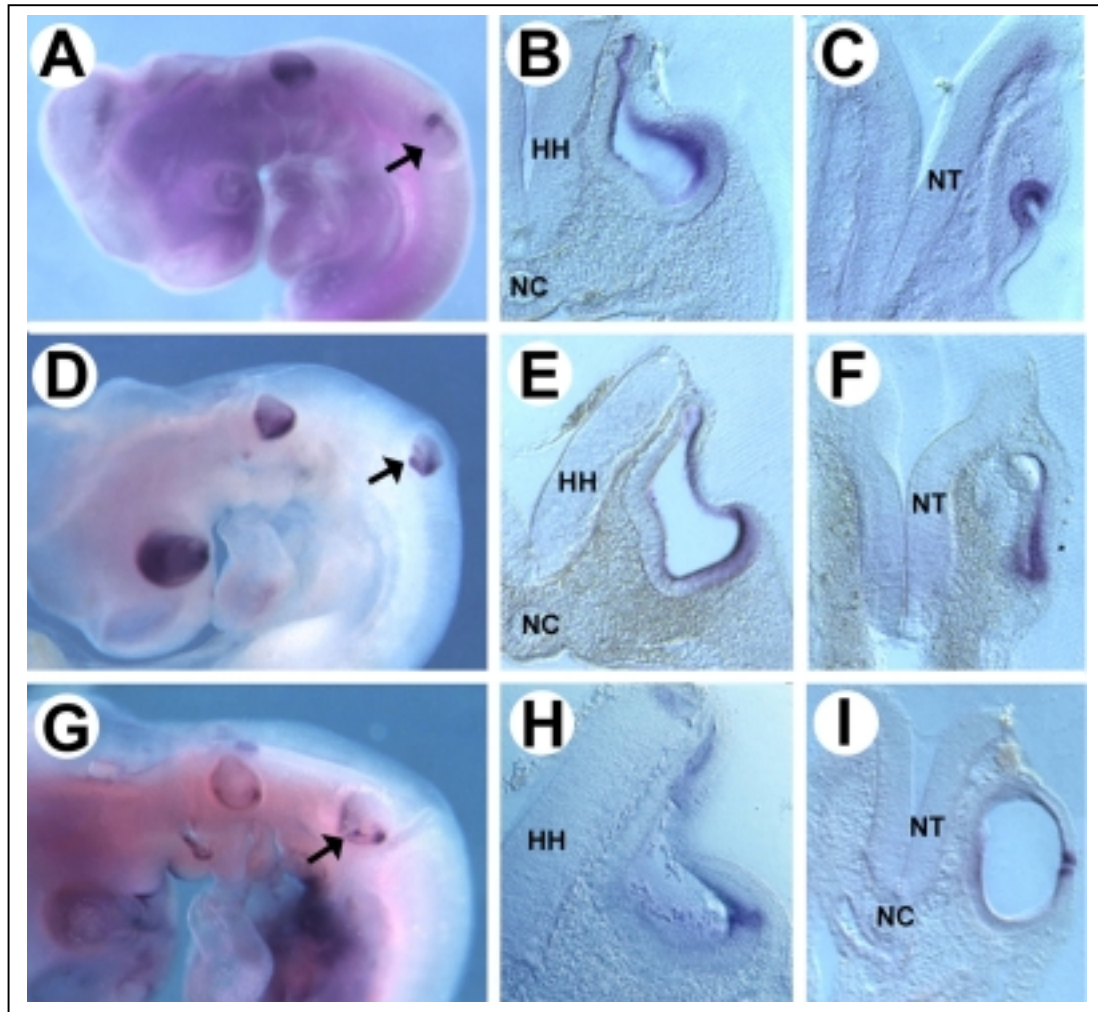


Abbildung 17: Genaktivität in Embryonen, bei denen Ohrplakoden in H.H.-Stadium 10-12 entlang der Neuralachse nach weiter kaudal auf die Höhe der Somiten 3/4 transplantiert wurden. Operierte Embryonen wurden nach zweitägiger Inkubation mit Digoxigenin markierten Gegensinn-Riboprobe für cNkx5-1 (A-C), SOHo (D-F) und BMP4 (G-I) hybridisiert. (A, D, G) Laterale Ansichten der operierten, rechten Seite; die Pfeile zeigen auf die ektopisch gebildeten Ohrvesikel. Transversalschnitte durch die endogenen (B, E, H) und ektopischen (C, F, I) Ohrvesikel der in A, D und G dargestellten Embryonen. Abkürzungen: HH: Hinterhirn; NC: Notochord; NT: Neuralrohr.

3.2.4 Transplantation in die Flügelknospen älterer Wirtsembryonen.

Die Transplantationen von frühem Ohrektoderm entlang der Neuralachse haben gezeigt, daß Aspekte der frühen Innenohrentwicklung auch außerhalb der kaudalen Hinterhirnregion nachvollzogen werden können. Je näher der Transplantationsort dabei bei der endogenen Ohrplakode lag, desto weiter konnte sich das transplantierte Ektoderm entwickeln. Um zu untersuchen, ob die Entwicklung des transplantierten Ohrektoderms von Wechselwirkungen mit Strukturen der Mittellinie abhängig ist, wurde Ohrektoderm verschiedener Entwicklungsstadien in die Flügelknospen drei Tage alter Wirtsembryonen (H.H.-Stadium 18-19) transplantiert. Wurden

die Ohrplakoden aus Spenderembryonen im 6-9 Somitenstadium (H.H.-Stadium 8-9) oder 10-12 Somitenstadium (H.H.-Stadium 10) entnommen, so entwickelten sie sich in den Flügelknospen in keinem Fall zum Ohrvesikel weiter und zeigten auch keine cNkx5-1-Expression. Wurde das Epithelium im späten Ohrgrubenstadium (H.H.-Stadium 13-14) transplantiert, so wurde in zwei von zehn untersuchten Embryonen ein Zusammenschluß zum Vesikel mit schwacher und diffuser cNkx5-1-Expression beobachtet (Tabelle 1, ohne Abbildung). Ohrektoderm, das erst im frühen Ohrvesikelstadium (H.H.-Stadium 18-19) ins Flügelknospenmesenchym transplantiert wurde, behielt seine Vesikelmorphologie nach zweitägiger Inkubation bei, zeigte jedoch auch kein Größenwachstum oder Anzeichen weiterer Differenzierung. cNkx5-1 „whole mount“ *in situ* Hybridisierungen der operierten Embryonen ergaben in den meisten (12/16) Fällen nur eine schwache und diffuse Anfärbung des ektopischen Epithels, wie exemplarisch in Abbildung 18 A-C gezeigt. In vier der 16 untersuchten Embryonen entsprach die Signalintensität im ektopischen Vesikel jedoch der des endogenen Ohrvesikels und die cNkx5-1-Transkripte waren auf einen Teil des Epithels beschränkt (Abb. 18 D-F).

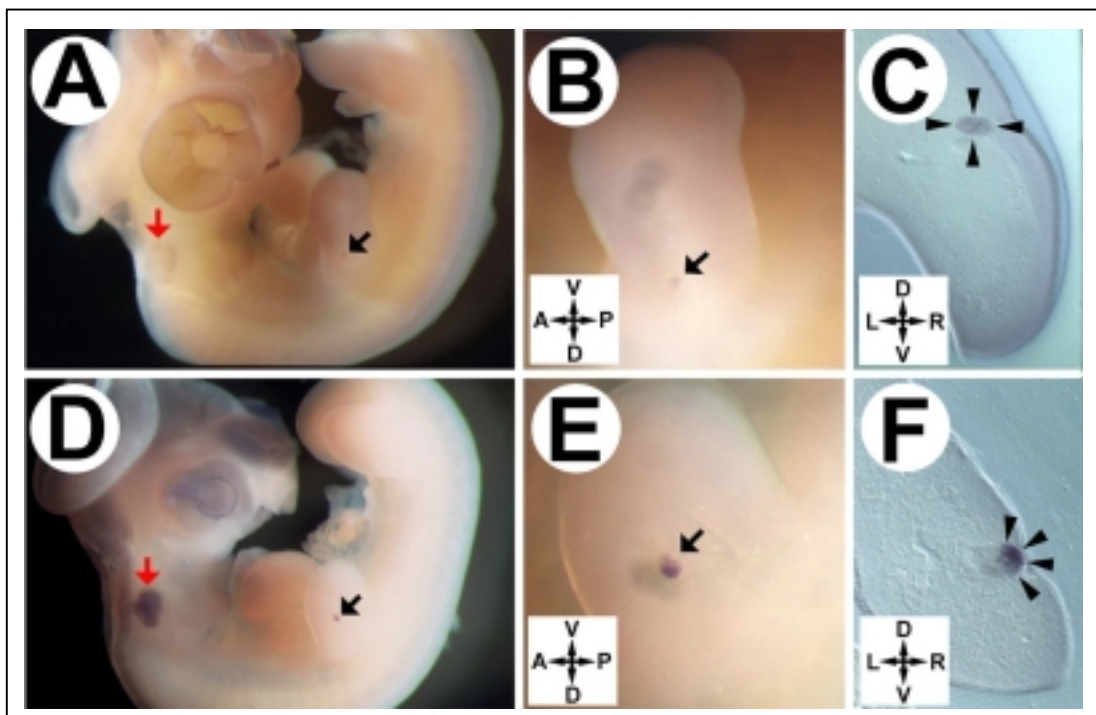


Abbildung 18: cNkx5-1-Expression in Embryonen, bei denen Ohrvesikel im H.H.-Stadium 18-19 *in ovo* in die Flügelknospen isochroner Wirtsembryonen transplantiert wurden nach zweitägiger Inkubation. A-C zeigt einen Embryo, bei dem diese Transplantation zu einer schwachen und diffusen Expression von cNkx5-1 führte, in einer lateralen Ansicht des gesamten Embryos (A), einer vergrößerten Ansicht der rechten, operierten Flügelknospe (B) und einem transversalen Vibratomechnitt durch das in die Flügelknospen transplantierte Ohrvesikel (C). D-F zeigt in entsprechenden Ansichten einen Embryo, bei dem die cNkx5-1-Transkripte nach Durchführung der gleichen Operation auf einen lateralen Abschnitt des Ohrvesikels beschränkt blieben und in ihrer Intensität der endogenen Situation entsprachen. Rote Pfeile markieren das endogene, schwarze Pfeile das in die Flügelknospen transplantierte Ohrvesikel. Schwarze Pfeilspitzen verdeutlichen die cNkx5-1-

Transkriptverteilung im transplantierten Innenohrepithelium. Abkürzungen: A: anterior; P: posterior; D: dorsal; V: ventral; L: links; R: rechts.

3.3 cNkx5-1- und BMP4-Expression wird *in vitro* in Ohrgruben-Explantaten aufrecht erhalten.

Um den Mechanismus der Lokalisierung der cNkx5-1-Transkripte innerhalb des Ohrepithels weiter zu charakterisieren, wurden Explantationsexperimente durchgeführt, bei denen Ohrektoderm entweder zusammen mit den umliegenden Geweben oder von diesen isoliert für 20 Stunden *in vitro* kultiviert wurde. Im Anschluß wurde die cNkx5-1-Transkriptverteilung analysiert. Vergleichend dazu wurde das Verhalten des BMP4-Gens untersucht, das bereits nach Transplantation von Ohrektoderm im Plakodenstadium kein plastisches Verhalten mehr gezeigt hatte.

Leider war es nicht möglich, frühes Ohrektoderm im Plakoden- oder frühen Ohrgrubenstadium (H.H.-Stadium 8-12), mit dem die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Transplantationsexperimente durchgeführt wurden, isoliert zu kultivieren. In diesem Stadium explantiertes Innenohrepithelium zeigte in Abwesenheit der umliegenden Gewebe keine Anzeichen von Proliferation oder fortgesetzter Morphogenese: die Einstülpung zur Ohrgrube und der Zusammenschluß zum Ohrvesikel blieben aus (nicht gezeigt). Daher wurden die Explantationsexperimente mit Ohrektoderm im Ohrgrubenstadium (H.H.-Stadium 13-14) durchgeführt. Zu diesem Entwicklungsstadium hat die Ohrgrube die Gestalt eines tiefen Bechers, und ihre dorsale Öffnung nimmt etwa 20% ihrer Oberfläche ein. Nach 20-stündiger *in vitro*-Inkubation entwickelte sich die Ohrgrube in jedem Fall zum vollständig geschlossenen Ohrvesikel weiter, sowohl, wenn sie zusammen mit den umliegenden Geweben als auch, wenn sie isoliert von diesen kultiviert wurde (Abb. 19). In beiden Gruppen von Explantaten wurde die Expression von cNkx5-1 und BMP4 aufrecht erhalten. In Ohrektoderm, das zusammen mit den angrenzenden Geweben explantiert und inkubiert wurde, waren die cNkx5-1 Transkripte ähnlich auf den dorsolateralen Abschnitt konzentriert wie in der endogenen Situation (Abb. 19 A und B). Dahingegen war der cNkx5-1-positive Bereich in den isoliert inkubierten Ohrepithelien deutlich verbreitert und diffuser begrenzt (Abb. 19 C und D). Ein qualitativ ähnliches Ergebnis bezüglich der cNkx5-1-Transkriptverteilung wurde nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 40 Stunden erhalten (nicht gezeigt). BMP4-Transkripte waren nach 20- und 40-stündiger Inkubation wie in der endogenen Situation jeweils auf zwei gegenüberliegende Foci beschränkt, unabhängig davon, ob das Ohrektoderm isoliert oder zusammen mit den benachbarten Geweben kultiviert wurde (ohne Abbildung).

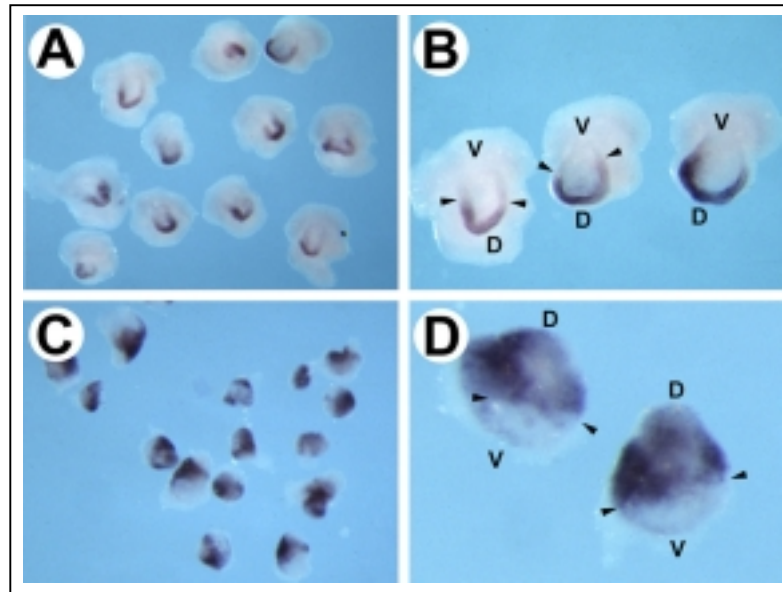


Abbildung 19: cNkx5-1-Genaktivität in Innenohrektoderm, das im Ohrgrubenstadium (H.H.-Stadium 13-14) explantiert und für 20 Stunden *in vitro* kultiviert wurde. (A, B) Kultivierung des Innenohrektoderms zusammen mit Hinterhirn-Neuroepithelium und Mesenchym. (C, D) Kultivierung von isoliertem Innenohrektoderm. Pfeilspitzen markieren die Grenzen zwischen cNkx5-1-positivem, dorsalem Vesikelabschnitt und cNkx5-1-freiem, ventralem Vesikelabschnitt. Die Orientierung der Explantate wurde anhand der Vesikelmorphologie (D) bzw. der Lage der Ohrvesikel im Explantat (B) bestimmt. Abkürzungen: D: dorsal; V: ventral.

3.4 Implantation von Neuroektoderm ventrolateral der Ohrplakode führt nicht zu einer Einengung der cNkx5-1-Expressionsdomäne.

Die Existenz von cNkx5-1-inhibierenden Signalen aus dem medial benachbarten Neuroektoderm würde sowohl die Begrenzung der cNkx5-1-Expression auf die dem Neuroektoderm abgewandte Vesikelwand in endogenen und ektopischen Vesikeln als auch die beobachtete Ausweitung der Domäne in isoliert kultiviertem Ohrektoderm erklären.

Um experimentell zu überprüfen, ob solche Signale im Embryo wirksam sind, wählte ich zwei verschiedene Ansätze: Zum einen wurde versucht, Wechselwirkungen zwischen Hinterhirn- und Ohrektoderm durch Implantation einer Goldbarriere zwischen beide Strukturen zu unterbinden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Abschnitt 3.5 beschrieben. Zum anderen wurden *in ovo* zusätzliche Stücke Neuroepithelium der Rhombomere 5/6 aus isochronen Spenderembryonen lateral zwischen Ohrplakode und Oberflächenektoderm transplantiert und die operierten Embryonen für weitere ein bis zwei Tage inkubiert. Falls das nun beiderseitig das Ohrephelium flankierende Neuroepithelium tatsächlich einen inhibierenden Einfluß auf die cNkx5-1-Aktivität ausübt, sollte die cNkx5-1-Domäne in den manipulierten Embryonen verkleinert sein. Der Ablauf der Transplantationsexperimente von Rhombomerhälften wird durch Abbildung 20 verdeutlicht:

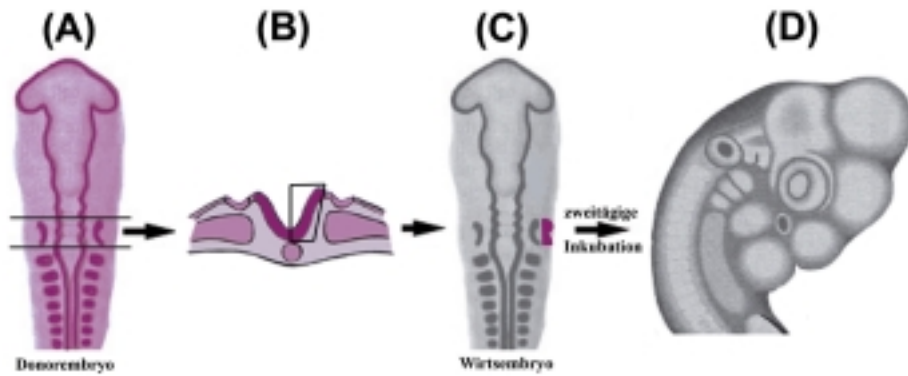


Abbildung 20: Skizze zur Veranschaulichung der Transplantationsexperimente von Rhombomer 5/6-Hälften lateral der Innenohrplakode. (A) Aus Spenderembryonen der H.H.-Entwicklungsstadien 8-9 bzw. 10-12 wurden auf Höhe der Rhombomere 5 und 6 transversale Körperscheiben entnommen. (B) Das Neuroektoderm der Rhombomere 5 und 6 wurde aus dem umliegenden Gewebe herausgelöst und entlang der Mittellinie in zwei Hälften getrennt. (C) Diese Rhombomer 5/6-Hälften wurden in zufälliger Orientierung ventrolateral der Ohrplakode isochroner Wirtsembryonen inseriert. (D) Nach ein- oder zweitägiger Inkubation wurden die Wirtsembryonen im Hinblick auf ihre Innenohrmorphogenese und cNkx5-1-Expression untersucht.

Insgesamt wurden 27 Embryonen im H.H.-Stadium 10-11 erfolgreich operiert. Ein besonders auffälliger Effekt dieses Eingriffs konnte nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden festgestellt werden: Hier waren in zehn von 15 operierten Embryonen die Ohrvesikel auf der rechten, operierten Seite in ihrer rostrokaudalen Ausdehnung um bis zu 25% größer als die Vesikel auf der linken, nicht-operierten Körperhälfte (Abb. 21 A-C und E-G). Transversalschnitte zeigten, daß die rechten Ohrvesikel auch in ihrer dorsoventralen Ausdehnung deutlich vergrößert waren (Abb. 21 D und H). Nach einer zweitägigen Inkubationszeit war der Effekt qualitativ der gleiche, jedoch weniger stark ausgeprägt. Hier entwickelten fünf von zwölf operierten Embryonen auf der Transplantationsseite ein bis zu 20% vergrößertes Ohrvesikel. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Hinterhirn einen proliferativen Einfluß auf das Wachstum des frühen Innenohrektoderms ausübt.

Auch die Lage der cNkx5-1-Expressionsdomäne wurde durch die Implantation des zusätzlichen Hinterhirnektoderms beeinflusst. Gegenüber der normalen Situation mit cNkx5-1-Transkripten im dorsolateralen Vesikelbereich war die Expressionsdomäne auf der operierten Seite nach ventromedial, d.h. in Richtung auf das Neuroektoderm-Transplantat, verlagert und leicht vergrößert (Abb. 21 H). Das zeigt, daß das Neuroektoderm des Hinterhirns, anders als vermutet, keinen inhibativen Einfluß auf die cNkx5-1-Genaktivität im Innenohrephithelium ausübt.

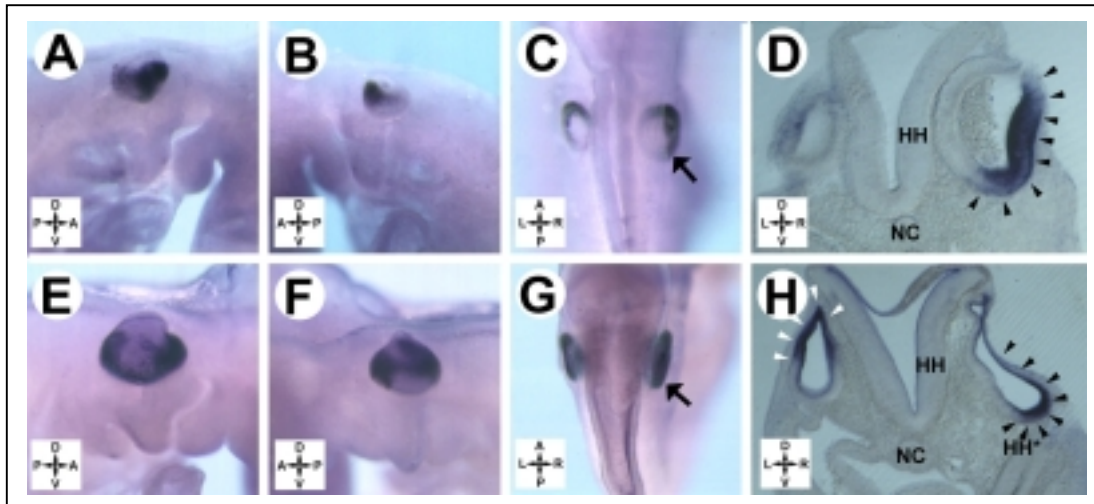


Abbildung 21: cNkx5-1-Genaktivität nach Implantation von Hinterhirn-ektoderm ventrolateral der Ohrplakode und 20-stündiger Inkubation. (A-D) und (E-H) zeigen zwei operierte Embryonen mit lateralen Ansichten der rechten, operierten (A, E) und der linken, nicht operierten (B, F) Seite, dorsalen Ansichten (C, G) und Transversalschnitten durch die otischen Vesikel (D, H). Schwarze Pfeile in C und G markieren das deutlich vergrößerte Ohrvesikel auf der operierten Seite des Embryos. Die Lage und Größe der cNkx5-1-Domäne wird im linken Ohrvesikel durch weiße, im rechten Ohrvesikel durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Auf der rechten Seite ist die cNkx5-1-Domäne deutlich nach ventromedial verschoben. Abkürzungen: A: anterior; D: dorsal; HH: Hinterhirn; L: links; NC: Notochord; P: posterior; R: rechts; V: ventral.

3.5 Die Implantation einer Goldbarriere zwischen Ohrplakode und Hinterhirn resultiert in verkleinerten Ohrvesikeln.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß von Interaktionen zwischen Neuroepithelium und Innenohrepithelium auf die Morphogenese des Innenohrs und die Verteilung der cNkx5-1-Transkripte zu untersuchen, stellt die Implantation einer Barriere aus Goldfolie zwischen Hinterhirn und Ohrplakode dar. Eine solche Goldbarriere sollte sowohl Wechselwirkungen, die einen direkten Kontakt beider Gewebe erfordern, als auch solche, die durch diffusible Signalmoleküle vermittelt werden, unterbinden. Die für die Implantationen verwendete Goldfolie hatte eine Dicke von 8 µm und wurde im Labor von M. Bronner-Fraser für eine ähnliche Zielsetzung erfolgreich eingesetzt (Stark et al., 1997).

Die Barrieren wurden im 5-12 Somitenstadium *in ovo* zwischen Hinterhirn und Ohrepithelium inseriert und die operierten Embryonen für weitere zwei Tage inkubiert. Von insgesamt 31 erfolgreich operierten Embryonen waren zehn in der gesamten Entwicklung des Hinterhirns und Mittelhirns so stark gestört, daß sie nicht in die weitere Auswertung einbezogen wurden. Morphologie und Größe der Ohrvesikel der restlichen 21 Embryonen wurden im gesamten Embryo und anhand von transversalen Gefrierschnitten beurteilt. Diese Analyse zeigte, daß die aus der Implantation der Goldbarrieren resultierenden Effekte sehr heterogen waren. In zwei der operierten

Embryonen wurde auf der operierten, rechten Seite kein Ohrvesikel geformt, während die Entwicklung auf der kontralateralen Seite normal verlief. In weiteren 16 Embryonen war das rechte Ohrvesikel in seiner Größe deutlich reduziert. Lediglich drei der 21 operierten Embryonen besaßen ein rechtes und ein linkes Ohrvesikel vergleichbarer Größe und Morphologie. Die Analyse der Gefrierschnitte zeigte, daß sich in elf der 21 Embryonen zwei durch die Goldbarriere voneinander getrennte Ohrvesikel ausgebildet hatten (Abb. 22). Dabei war es auffällig, daß die cNkx5-1-Transkripte in zehn dieser elf Embryonen auf das lateral der Goldbarriere gebildete Ohrvesikel beschränkt waren und das medial zwischen Hinterhirn und Implantat liegende Vesikel keine cNkx5-1-Expression zeigte (Abb. 22 C und F). Nur in einem Fall waren auch in einem kleinen Abschnitt des medialen Ohrvesikels cNkx5-1-Transkripte nachweisbar, während hier das gesamte Epithel des lateralen Vesikels positiv für cNkx5-1 war. Die Entstehung von zwei Ohrvesikeln könnte verschiedene Ursachen haben: Zum einen wäre es möglich, daß die Goldbarriere nicht exakt zwischen Hinterhirn und Plakodenektoderm platziert wurde sondern zu weit lateral, so daß das Ohrektoderm in zwei Teile geteilt wurde, die sich jeweils zu eigenen Vesikeln zusammenschlossen. Eine andere denkbare Ursache wäre die Neuinduktion von Ohrektoderm medial der Plakode durch das benachbarte Neuroepithelium des Hinterhirns und die Formierung des lateralen Vesikels aus dem ursprünglichen Plakodenektoderm. Beide Möglichkeiten und ihre jeweiligen Konsequenzen werden in Abschnitt 4.3 der Diskussion ausführlich erläutert.

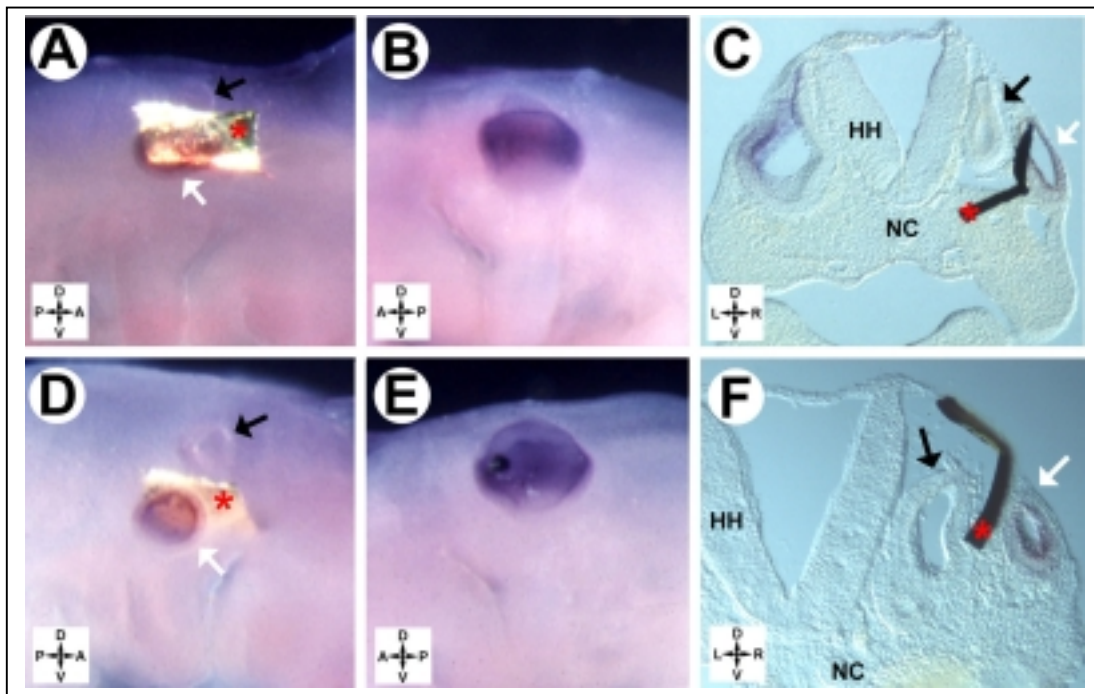


Abbildung 22: cNkx5-1-Genaktivität nach Implantation einer Goldbarriere zwischen Ohrplakode und Hinterhirnektoderm und 44-stündiger Inkubation. (A-C) und (D-F) zeigen zwei operierte Embryonen in lateraler Ansicht der Kopfregionen der rechten, operierten (A und D) und der linken, nicht-operierten (B und E) Seite sowie je einen repräsentativen Transversalschnitt durch die Ohrvesikel (C und F). Die Goldbarriere ist durch rote Sternchen gekennzeichnet. Die „whole mount“-Aufnahmen (A und D) und Schnitte (C und F) zeigen

deutlich, daß in beiden Embryonen zwei eigenständige, geschlossene Ohrvesikel medial (schwarze Pfeile) und lateral (weiße Pfeile) der Barriere ausgebildet wurden. cNkx5-1-Aktivität ist jeweils auf das laterale Vesikel beschränkt. Die Orientierung der Embryonen wird durch Pfeildiagramme verdeutlicht. Abkürzungen: A: anterior; D: dorsal; HH: Hinterhirn; L: links; NC: Notochord; P: posterior; R: rechts; V: ventral.

3.6 BMP und Noggin üben einen entgegengesetzten Einfluß auf die Innenohrmorphogenese aus.

„Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) sind Mitglieder der „Transforming Growth Factor-beta“ (TGF- β) Superfamilie und wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, eine ektopische Knochenbildung zu induzieren, identifiziert (Urist et al., 1979; Wozney et al., 1988). Seither konnte gezeigt werden, daß BMPs in vielen Organismen entscheidende Funktionen in den verschiedensten Prozessen der Embryogenese ausüben, beispielsweise in der Spezifizierung der Achsen, der Organogenese und der Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen (Übersichtsartikel von Hogan, 1996).

In vielen dieser Organe, wie etwa im Neuralrohr und den Somiten (McMahon et al., 1998), in den Extremitäten (Capdevila et al., 1998) und möglicherweise auch im Herzen (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998) interagieren BMPs mit einem ihrer Antagonisten, Noggin, und steuern so Musterbildungs- und Zelldifferenzierungsprozesse. Das sekretierte Glykoprotein Noggin inhibiert BMP-Signalaktivität, in dem es direkt an BMP-Proteine bindet und so deren Rezeptorbindung verhindert (Zimmerman et al., 1996). Bereits während der frühen Phase der Innenohrentwicklung werden BMP4, BMP7 und transient auch BMP5 sowohl im Innenohrepithelium selbst als auch in benachbarten Geweben exprimiert (Oh et al., 1996). Der BMP-Antagonist Noggin wird im periotischen Mesenchym direkt anterior und posterior der invaginierenden Ohrplakode, aber nicht im Ohrektoderm selbst exprimiert (Chang et al., 1999). Diese Expressionsmuster lassen vermuten, daß der BMP-Signalübertragungsweg auch an der Steuerung der Innenohrmorphogenese beteiligt sein könnte.

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurden Zellaggregate, die den Wachstumsfaktor BMP2 bzw. den BMP-Antagonisten Noggin produzieren, in Hühnchenembryonen *in ovo* unmittelbar anterior und posterior der Ohrplakode implantiert. Die operierten Embryonen wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Hinblick auf ihre Innenohrmorphogenese und die Expression verschiedener Markergene analysiert. Der Ablauf der Implantationsexperimente wird durch die nachstehende Skizze veranschaulicht:

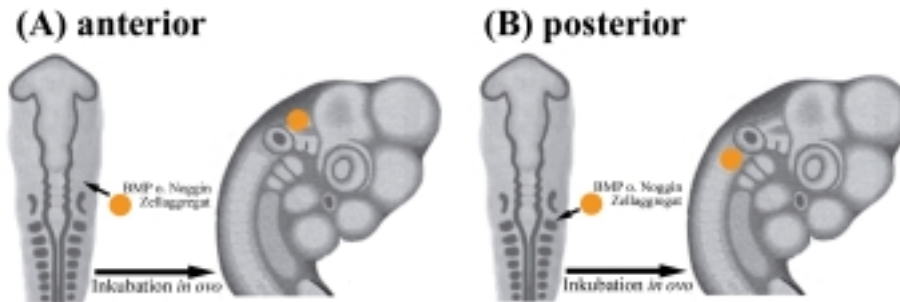


Abbildung 23: Skizze zur Veranschaulichung der Implantationsexperimente von BMP- bzw. Noggin-produzierenden Zellaggregaten. Die Zellaggregate wurden *in ovo* (A) anterior oder (B) posterior der rechten Innenohrplakode von Wirtsembryonen im H.H.-Stadium 10 implantiert, die operierten Embryonen für ein bis fünf Tage inkubiert und bezüglich ihrer Innenohrmorphogenese und Markergenexpression analysiert.

3.6.1 Ektopische BMP-Quellen induzieren transiente epitheliale Strukturen im Innenohr.

Aggregate von Wachtelzellen der Linie Q2bn, die humanes BMP2 produzieren, wurden *in ovo* unmittelbar anterior und posterior der Plakode implantiert. Die Implantation erfolgte in Hühner-Wirtsembryonen im Hamburger-Hamilton Stadium 10, d.h., kurz nach dem die Ohrplakode morphologisch erkennbar ist. Die operierten Embryonen wurden für weitere ein bis fünf Tage inkubiert.

In situ Hybridisierungen mit einer humanen BMP2-Gegensinn-Probe zeigten, daß die implantierten Zellaggregate im Wirtsembryo für 24-36 Stunden auf hohem Niveau BMP2 exprimierten, während nach dreitägiger Inkubation keine BMP2-Transkripte mehr nachgewiesen werden konnten (ohne Abbildung). Nach 24- bis 48-stündiger Inkubation sahen wir keine auffälligen Veränderungen der Ohrmorphologie auf der operierten Seite des Embryos. Nach 72-stündiger Inkubation war im endogenen Ohrvesikel das Auswachsen der Bogengänge und des endolymphatischen Gangs auf der dorsalen und des cochleären Gangs auf der ventromedialen Seite des Vesikels zu erkennen. Auf der operierten, rechten Seite war in 20% der Embryonen das Auswachsen einer zusätzlichen, möglicherweise Bogengang-ähnlichen Struktur von der ventrolateralen Seite des Vesikels nach ventromedial zu beobachten (Abb. 24 A-C). Das Auftreten solcher zusätzlicher Strukturen schien transient zu sein: Nach fünftägiger Inkubation der operierten Embryonen konnten das rechte, manipulierte und das linke, nicht-operierte Ohr auf H/E-gefärbten Paraffinschnitten von sieben analysierten Embryonen nicht mehr unterschieden werden. Die zur Kontrolle durchgeführten Implantationen von Zellaggregaten, die ein BMP2-Gegensinn-Transkript exprimierten, hatten dagegen keinen Effekt auf die Ohrmorphogenese.

3.6.2 Ektopische Noggin-Quellen blockieren die Innenohrmorphogenese im Ohrvesikelstadium.

Um die Spezifität des von BMP vermittelten Effekts zu überprüfen, wurden in gleicher Weise Aggregate von Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, die den BMP-Antagonisten Noggin produzieren, implantiert. Ähnlich wie bei den BMP-Implantationen konnten wir nach ein- oder zweitägiger Inkubation keine morphologischen Veränderungen in den operierten Embryonen feststellen. Nach drei- oder viertägiger Inkubation beobachteten wir dann jedoch in allen acht untersuchten Embryonen eine Arretierung der Innenohrmorphogenese im Ohrvesikelstadium. Auf der rechten Implantationsseite sahen wir weder das Auswachsen der Bogengangprimordien oder des endolymphatischen Gangs noch die Bildung des cochleären Gangs. Auf der linken, nicht operierten Seite desselben Embryos liefen diese Prozesse unbeeinflusst ab (Abb. 24, D und E).

Die zur Kontrolle durchgeführten Implantationen von Wildtyp-CHO-Zellen hatten keinen Effekt auf die Innenohrmorphogenese. Im Gegensatz zu den BMP-Implantationen konnte die normale Innenohrmorphogenese nach Noggin-Behandlung, wie H/E-gefärbte Transversalschnitte von vier in Paraffin eingebetteten Embryonen zeigten, nach verlängerter Inkubation für sechs oder sieben Tage nicht wiederhergestellt werden (ohne Abbildung).

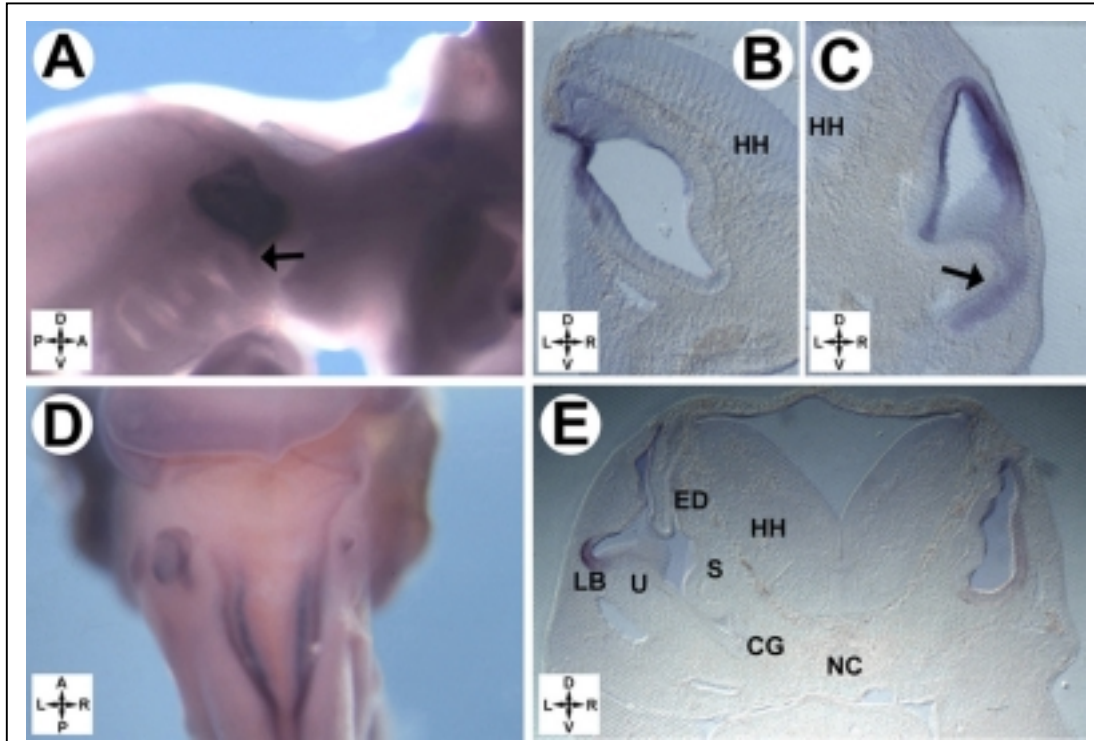


Abbildung 24: Entgegengesetzte Effekte von BMP und Noggin auf die frühe Morphogenese des Innenohrs. (A-C) Embryo nach Implantation BMP2-exprimierender Zellaggregate posterior der Ohrplakode und 72-stündiger Inkubation. A zeigt eine laterale Ansicht der operierten, rechten Seite, B einen Transversalschnitt durch das linke Ohrvesikel und C einen Transversalschnitt durch das rechte Ohrvesikel. Schwarze Pfeile

markieren eine ektopische, nach ventromedial gerichtete, epitheliale Struktur auf der operierten Seite des Embryos. (D, E) Embryo nach Implantation Noggin exprimierender Zellaggregate posterior der Ohrplakode und 96-stündiger Inkubation. Die dorsale Ansicht der Hinterhirnregion (D) und der Transversalschnitt (E) zeigen deutlich, daß das Ohrvesikel auf der operierten, rechten Seite sowohl bezüglich seiner rostrokaudalen als auch seiner dorsoventralen Ausdehnung deutlich reduziert ist. Abkürzungen: A: anterior; CG: cochleärer Gang; D: dorsal; ED: Endolymphatischer Gang; HH: Hinterhirn; NC: Notochord; L: links; LB: Ausstülpung des lateralen Bogengangs; R: rechts; S: Sacculus; U: Utriculus; V: ventral.

3.6.3 BMP und Noggin bewirken entgegengesetzte Veränderungen im Expressionsmuster ohrspezifischer Gene.

Den durch BMP und Noggin verursachten Veränderungen der Innenohrmorphologie nach drei- und viertägiger Inkubation sollten Veränderungen der Genaktivitäten ohrspezifischer Gene vorausgehen. Daher wurden die Expressionsmuster der Gene cNkx5-1, SOHo, Dlx5 und Pax2 einen Tag nach der Implantation einer ektopischen BMP- bzw. Noggin-Quelle analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 25 zusammengefaßt. Für jede Gruppe wurden mindestens sieben erfolgreich operierte Embryonen analysiert und die dorsoventrale Transkriptverteilung anhand von transversalen Vibratomschnitten ermittelt. In einigen Embryonen wurden die implantierten Zellaggregate zusätzlich zum untersuchten Markergen durch gleichzeitigen Nachweis von humanem BMP2 sichtbar gemacht (Abb. 25 B1, C1, A2, C2 und D2).

	BMP2				Noggin			
	anterior		posterior		anterior		posterior	
	Antwort	Anzahl	Antwort	Anzahl	Antwort	Anzahl	Antwort	Anzahl
Nkx5.1	++	15	+++	18	---	15	---	14
SOHo1	0	14	+	12	-	15	--	15
Dlx5	++	7	+	8	---	7	---	7
Pax2	0	7	0	7	0	7	0	7

Tabelle 3: Auswirkungen einer ektopischen Quelle des Wachstumsfaktors BMP2 bzw. seines Antagonisten Noggin in direkter Nachbarschaft zur otischen Plakode auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren cNkx5-1, SOHo, Dlx5 und Pax2. N bezeichnet die Anzahl der für jede Operation analysierten Embryonen. +: Verstärkung der Expression und/oder eine Erweiterung der Expressionsdomäne, -: Abschwächung der Expression und/oder Verkleinerung der Expressionsdomäne. Die Anzahl der Zeichen quantifiziert den jeweiligen Effekt in +++ / ---: sehr stark, ++ / --: deutlich sichtbar und + / -: schwach. 0 bezeichnet eine unveränderte Expression.

Als Reaktion auf die Implantation einer ektopischen BMP2-Quelle posterior der Ohrplakode beobachteten wir eine deutliche Verstärkung und Erweiterung der cNkx5-1-Expressionsdomäne nach posterior und ventral in 16 von 18 operierten Embryonen (Abb. 25 A2). Wurde die BMP-Quelle anterior der Ohrplakode in enger Nachbarschaft zur cNkx5-1-Expressionsdomäne platziert, resultierte das in einem Anstieg der Signalintensität in den meisten (10/15) und einer kaudalen und ventralen Erweiterung der cNkx5-1-Domäne in einigen (5/15) der operierten Embryonen (Abb. 25 A1). Die Einführung einer ektopischen Quelle des BMP-Antagonisten Noggin in die Nachbarschaft der Ohrplakode hatte hingegen genau den umgekehrten Effekt auf die cNkx5-1-Expression: cNkx5-1-Transkription im Ohrepithelium wurde nach einer Implantation an den anterioren Pol der Ohrplakode in allen (15/15) analysierten Embryonen vollständig abgeschaltet (Abb. 25 A3). Nach einer Implantation an den posterioren Pol unterblieb die cNkx5-1-Expression in beinahe allen (13/14) analysierten Embryonen (Abb. 25 A4).

Ein ähnliches Verhalten zeigte auch das Homöoboxgen *Dlx5*, ein Transkriptionsfaktor der *Distal-less* Genfamilie (Pera et al., 1999). In der Maus wird *Dlx5* an Embryonaltag 8,0, unmittelbar nach der Ausbildung der Ohrplakode, in einem dorsokaudalen Abschnitt der Plakode aktiviert. In den folgenden Stadien der Innenohrmorphogenese wird *Dlx5* überlappend mit *Nkx5-1* im dorsalen Anteil des Epitheliums am stärksten exprimiert, aus dem später vestibuläre Strukturen sowie der endolymphatische Gang entstehen (Simeone et al., 1994; Qiu et al., 1997; Yang et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesem Aktivitätsmuster zeigen *Dlx5* „knock-out“-Mäuse Defekte in der Morphogenese der Bogengänge und des endolymphatischen Gangs und Sacks (Depew et al., 1999; Acampora et al., 1999). Nach Implantation einer ektopischen BMP2-Quelle anterior oder posterior der Ohrplakode kam es in allen untersuchten Embryonen zu einer deutlichen Verstärkung des *Dlx5*-Signals im dem Implantat zugewandten Abschnitt des Ohrepithels (Tabelle 2 und Abbildung 25 C1 und C2). Da die endogene *Dlx5*-Expression ohnehin den gesamten dorsalen Abschnitt des Ohrepithels umfaßt, kann dieser Effekt lediglich als Verstärkung der Signalintensität und nicht als Erweiterung der Expressionsdomäne sichtbar werden. Die Implantation von Zellaggregaten des BMP-Antagonisten Noggin anterior oder posterior der Ohrplakode führte hingegen auch beim *Dlx5*-Gen zur vollständigen oder annähernd vollständigen Auslöschung der Expression im Ohrepithelium aller untersuchten Embryonen (Abb. 25 C3 und C4 sowie Tabelle 3).

Anders als cNkx5-1 und *Dlx5* zeigte das Homöoboxgen *SOHo* überraschenderweise keine entgegengesetzte Reaktion auf die Implantation von BMP2- bzw. Noggin-produzierenden Zellaggregaten. Infolge anteriorer BMP-Implantate konnte in keinem der 14 analysierten Embryonen eine Veränderung der *SOHo*-Expressionsdomäne im Ohrepithelium beobachtet werden (Abb. 25 B1). Nach Implantation an das posteriore Ende der Ohrplakode, das an die endogene *SOHo*-Domäne im Ohrepithel angrenzt, war in drei der zwölf analysierten Embryonen eine geringfügige Verstärkung des *SOHo*-Signals (nicht gezeigt) und in den übrigen neun Embryonen keine Veränderung der *SOHo*-Transkription zu erkennen (Abb. 25 B2). Obwohl BMP2

offensichtlich nur einen geringen Einfluß auf die SOHo-Expression hatte, wurde die SOHo-Aktivität durch die Implantation einer ektopischen Noggin-Quelle deutlich reduziert (Tabelle 2 und Abbildung 25 B3 und B4). Dieser Effekt war besonders deutlich sichtbar, wenn die Noggin-produzierenden Zellaggregate posterior der Ohrplakode, direkt angrenzend an die SOHo-Expressionsdomäne, implantiert wurden. In diesem Fall war in drei von 15 Embryonen eine vollständige Auslöschung des SOHo-Signals, in sechs von 15 Embryonen eine deutliche Reduktion (Abb. 25 B4), in fünf von 15 Embryonen eine leichte Abschwächung und in einem von 15 Embryonen kein Effekt zu beobachten. Einen geringeren Einfluß auf die SOHo-Aktivität zeigten anteriore Noggin-Implantate, die in wesentlich größerer Distanz zur endogenen SOHo-Domäne platziert wurden. Hier wurde in einem der 15 Embryonen eine vollständige Auslöschung des SOHo-Signals, in drei von 15 Embryonen eine deutliche Reduktion, in acht von 15 Embryonen eine leichte Abschwächung (Abb. 25 B3) und in drei von 15 Embryonen kein Effekt beobachtet.

Auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors Pax2 im Ohrektoderm nahm schließlich weder die Implantation einer ektopischen BMP-Quelle noch die einer zusätzlichen Noggin-Quelle einen Einfluß (Tabelle 2 und Abbildung 25 D1-D4). Für jede Manipulation wurden sieben Embryonen mit einer Pax2-Probe hybridisiert. Weder die Untersuchung der gesamten Embryonen noch die anschließende Analyse der dorsoventralen Transkriptverteilung auf Transversalschnitten der eingebetteten Embryonen zeigten irgendeine Veränderung im Pax2-Muster oder seiner Expressionsstärke im Ohrvesikel. Dahingegen hatte die Implantation beider Signalmoleküle einen deutlichen Einfluß auf die Pax2-Aktivität im Bereich der Kiemenbögen. Hier führte die Einführung BMP-produzierender Zellaggregate anterior oder posterior der Ohrplakode in der Mehrzahl der analysierten Embryonen zu einer deutlichen Reduktion oder Auslöschung der Pax2-Aktivität in der Umgebung des Implantats (Abb. 25 D1 und D2). Interessanterweise hatte eine ektopische Noggin-Quelle den gleichen Effekt. In etwa der Hälfte der untersuchten Embryonen konnte eine deutliche Abschwächung oder sogar vollständige Auslöschung des Pax2-Signals in der Umgebung des Noggin-produzierenden Zellaggregats beobachtet werden (Abb. 25 D4).

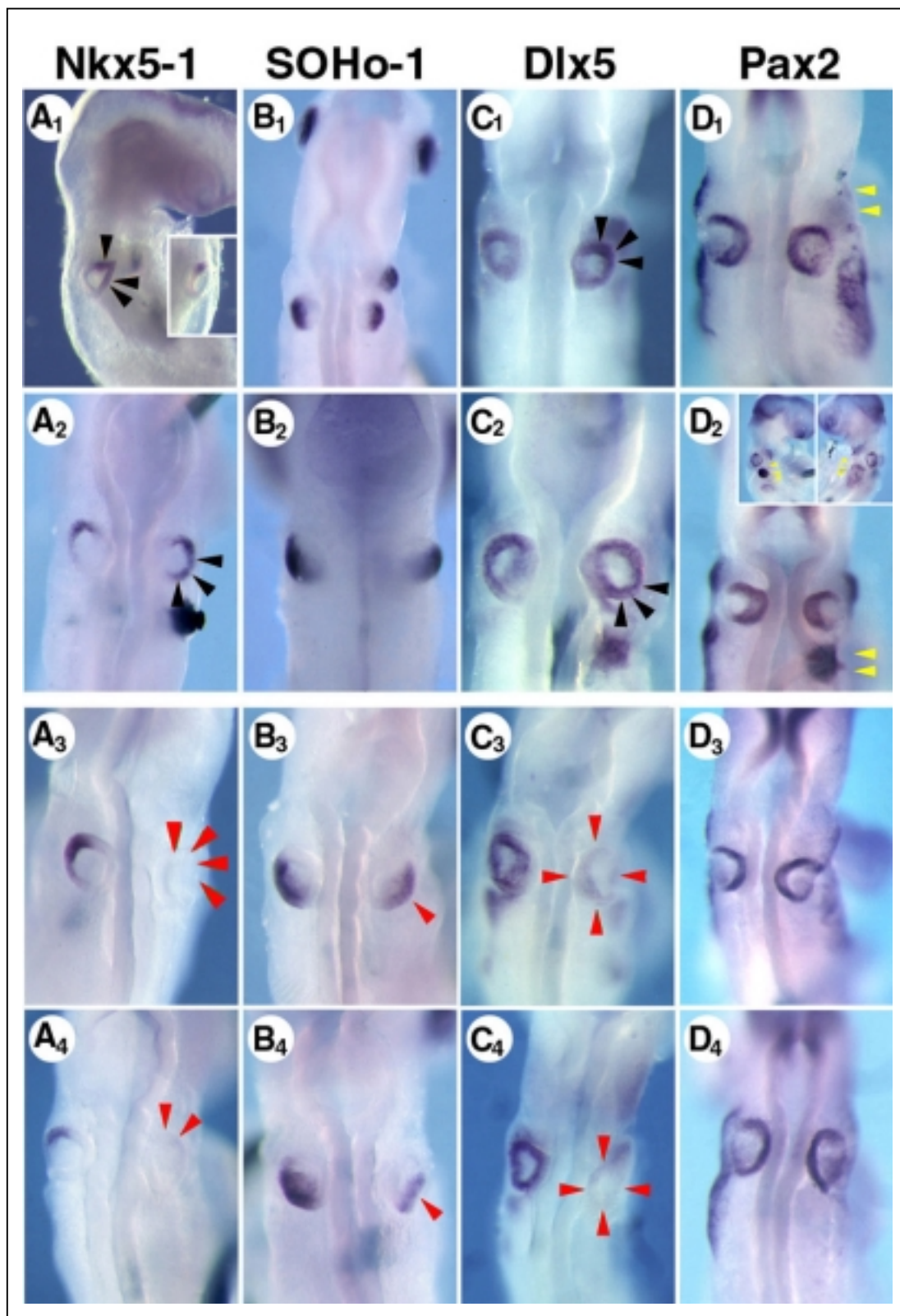


Abbildung 25: Entgegengesetzter Einfluß von BMP und Noggin auf die Aktivität der innenohrspezifischen Gene cNkx5-1, SOHo, Dlx5 und Pax2. Gezeigt sind repräsentative Embryonen in dorsaler Ansicht der Hinterhirnregion nach Implantation von BMP (Indizes 1 und 2) bzw. Noggin (Indizes 3 und 4) exprimierenden Zellaggregaten anterior (Indizes 1 und 3) oder posterior (Indizes 2 und 4) der Ohrplakode. Nach 20-stündiger Inkubation wurde die Expression von cNkx5-1 (A1-A4), SOHo (B1-B4), Dlx5 (C1-C4) und Pax2 (D1-D4)

untersucht. A1 zeigt die rechtsseitige Ansicht eines Embryos nach Implantation BMP-exprimierender Zellen anterior der Ohrplakode und cNkx5-1-Hybridisierung. Das Insert zeigt das linke Ohrvesikel des gleichen Embryos. Schwarze Pfeilspitzen weisen auf Verstärkung und/oder Erweiterung der Expression von cNkx5-1 (A1, A2) und Dlx5 (C1, C2) im Innenohrvesikel infolge einer ektopischen BMP-Quelle in Nachbarschaft zur Ohrplakode hin. Rote Pfeilspitzen markieren die Reduktion der Innenohr-Expression von cNkx5-1 (A3, A4), SOHo (B3, B4) und Dlx5 (C3, C4) nach Implantation einer ektopischen Noggin-Quelle. Gelbe Pfeilspitzen in D1 und D2 kennzeichnen die Reduktion der Pax2-Expression im Epithelium der Kiemenbögen nach BMP-Behandlung der Embryonen. In D2 wird die Reduktion der Pax2-Transkripte im Epithelium der Kiemenbögen durch Insertion lateraler Ansichten des Embryos verdeutlicht. In A2, B1, C1, C2, D1 und D2 wurde die Lage der BMP-exprimierenden Zellaggregate durch gleichzeitige Hybridisierung mit einer humanen BMP2-Probe sichtbar gemacht.

3.6.4 BMP und Noggin erhöhen die Apoptoserate im Innenohrepithelium.

Wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, führte die Implantation einer ektopischen BMP2-Quelle zum Auswachsen zusätzlicher Innenohrstrukturen, während Noggin die Morphogenese im Ohrvesikelstadium arretierte. Um zu untersuchen, inwieweit diese morphogenetischen Defekte mit Veränderungen der Zellproliferation bzw. der Apoptoserate korrelieren, wurde eine TUNEL-Anfärbung zum Nachweis von Zellen, die einen programmierten Zelltod durchlaufen, durchgeführt. Überraschenderweise zeigte die Implantation der beiden antagonistischen Faktoren den gleichen Effekt: eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Innenohrvesikel auf der operierten Seite.

Die Ergebnisse nach Implantation einer ektopischen BMP-Quelle und 20-stündiger Inkubation sind in Abbildung 26 zusammengefaßt. Insgesamt wurden sieben Embryonen mit anteriorem BMP-Implantat (Abb. 26 A-D), sieben Embryonen mit posteriorem BMP-Implantat (Abb. 26 E und F) und jeweils drei Embryonen mit Kontrollimplantaten (ohne Abbildung) analysiert. Unabhängig von der Lage des Implantats zeigten alle untersuchten Embryonen eine massive Zunahme apoptotischer Zellen in ektodermalen aber nicht in mesodermalen Strukturen in der Umgebung des Implantats. Diese war nicht nur im Innenohrepithelium sondern auch im lateral angrenzenden Oberflächenektoderm und im Neuroepithelium des Hinterhirns zu beobachten. Auffällig war zudem, daß nach 20-stündiger Kultivierung bereits ein großer Anteil der implantierten, BMP-sezernierenden Zellen selbst stark apoptotisch war. Diese Beobachtung korreliert mit der Beobachtung, daß BMP2-Transkripte nur über einen Zeitraum bis zu 36 Stunden detektiert werden konnten (Abschnitt 3.6.1). In Embryonen, die ein Kontrollimplantat erhalten hatten, war die Anzahl apoptotischer Zellen in der Umgebung des Implantats nicht erhöht.

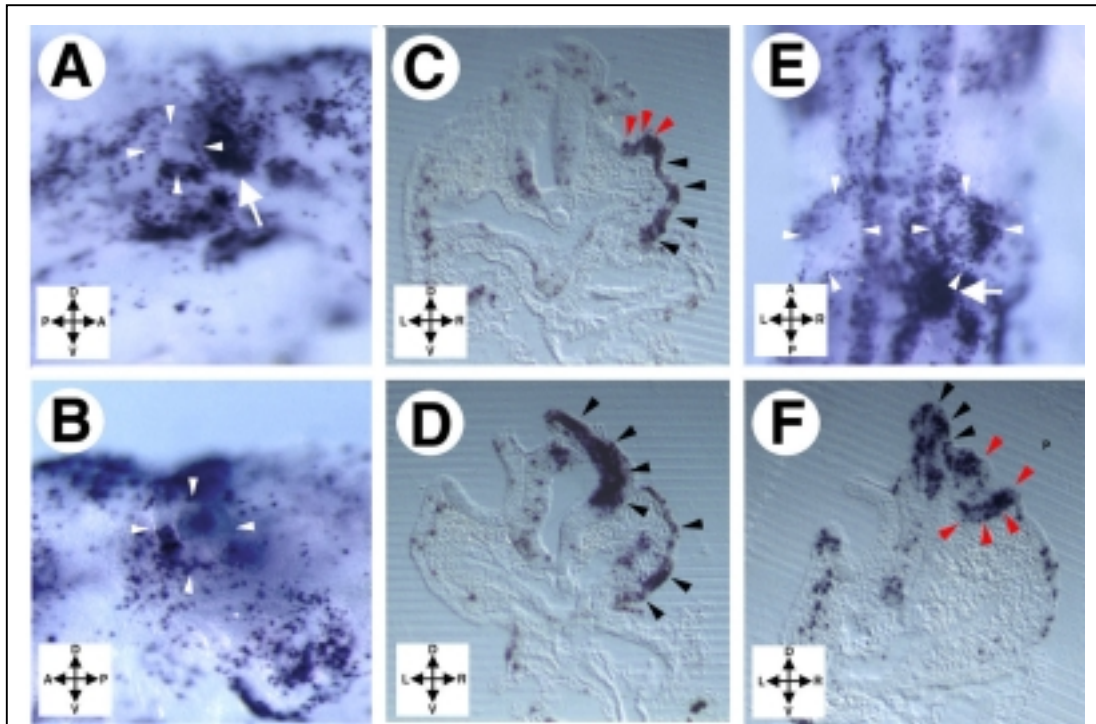


Abbildung 26: „Whole mount“ TUNEL-Anfärbung apoptotischer Zellen nach Implantation einer ektopischen BMP2-Quelle anterior (A-D) bzw. posterior (E, F) der Ohrplakode und 20-stündiger Inkubation. (A,B) Laterale Ansichten der operierten, rechten Seite (A) und der nicht-operierten, linken Seite desselben Embryos (B). (C, D) Transversalschnitte durch das rechte (C) bzw. linke (D) Ohrvesikel des in A und B gezeigten Embryos. (E) Dorsale Ansicht eines Embryos mit posteriorem Zellaggregat und (F) Transversalschnitt durch die Ohrvesikel des in E gezeigten Embryos. Weiße Pfeile markieren die Aggregate BMP2-produzierender Zellen, weiße Pfeilspitzen die Innenohrvesikel. Rote Pfeilspitzen kennzeichnen stark apoptotische Bereiche im Innenohrrektoderm, schwarze Pfeilspitzen apoptotische Bereiche in anderen epithelialen Strukturen. Abkürzungen: A: anterior; D: dorsal; L: links; P: posterior, R: rechts, V: ventral.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach Implantation von Noggin-produzierenden Zellaggregaten (Abb. 27). Auch hier wurden jeweils sieben Embryonen mit anteriorem oder posteriorem Noggin-Implantat und drei Embryonen mit Kontrollimplantaten auf ihr Apoptoseverhalten untersucht.

Überraschenderweise zeigten alle untersuchten Noggin-behandelten Embryonen ebenfalls eine deutlich erhöhte Apoptoserate in ektodermalen Strukturen, die dem Implantat benachbart waren (Abb. 27 C und F). Auch die Noggin-produzierenden Zellaggregate selbst wiesen nach 20-stündiger Kultivierung bereits einen hohen Anteil apoptotischer Zellen auf (Abb. 27 A und D). In Embryonen, die ein Kontrollimplantat empfangen hatten, war die Apoptoserate auf der operierten und unoperierten Seite unverändert.

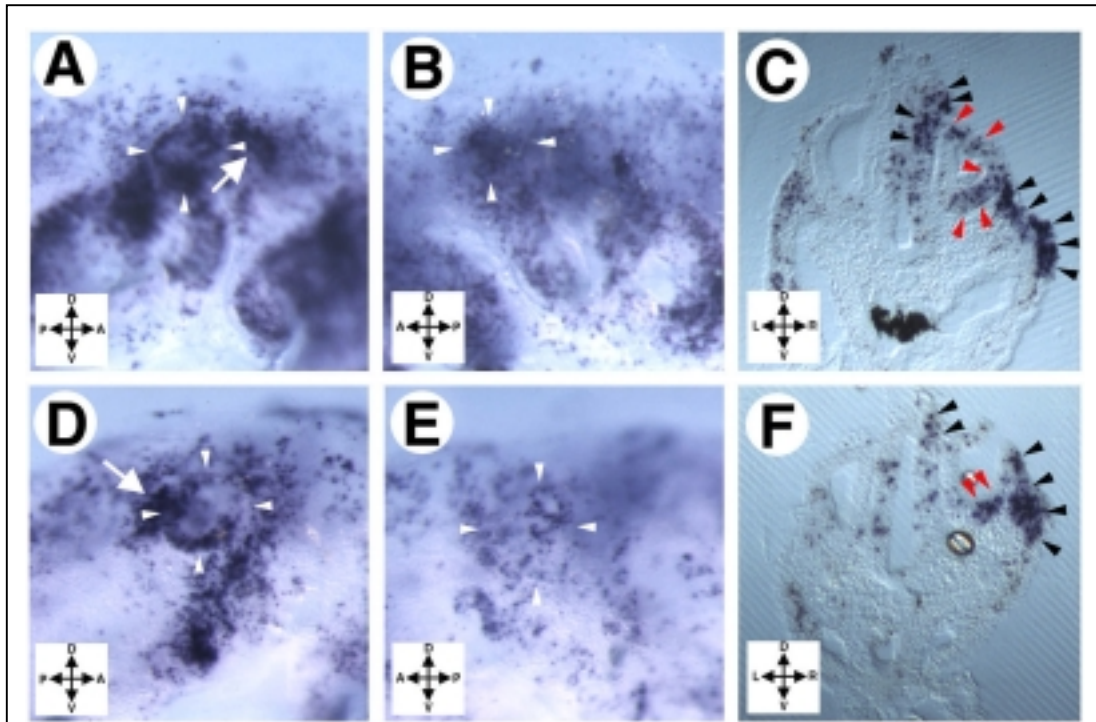


Abbildung 27: „Whole mount“ TUNEL-Anfärbung apoptotischer Zellen nach Implantation einer ektopischen Noggin-Quelle anterior (A-C) bzw. posterior (D-F) der Ohrplakode und 20-stündiger Inkubation. Gezeigt sind jeweils laterale Ansichten der Ohrregion der operierten, rechten Seite des Embryos (A, D) und der nicht-operierten, linken Seite desselben Embryos (B, E) sowie repräsentative Transversalschnitte durch die otischen Vesikel (C, F). Weiße Pfeile in A und D markieren die Aggregate Noggin-produzierender Zellen, weiße Pfeilspitzen die Position des Ohrvesikels. Rote Pfeilspitzen weisen auf apoptotische Zellen im Innenohrepithelium hin, während schwarze Pfeilspitzen apoptotische Bereiche im Neuroepithelium und Oberflächenepithelium markieren. Abkürzungen: A: anterior; D: dorsal; L: links; P: posterior, R: rechts, V: ventral.

4. Diskussion

Die molekularen Vorgänge, die zur Induktion und Regionalisierung der Innenohrplakode in Vertebraten führen, sind erst ansatzweise untersucht und verstanden. Die Grundlage für ein Verständnis dieser Prozesse bilden einerseits klassische, embryologische Manipulationen zur Aufklärung von Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben und auf molekularer Ebene andererseits die Beschreibung im Ohr exprimierter Gene. Ein Zusammenhang zwischen beiden Feldern kann teilweise durch Geninaktivierung in der Maus oder die Analyse von Maus- oder Fischmutanten hergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verknüpfung klassischer, manipulativer Experimente mit der molekularen Analyse von Genaktivitäten. Ein solches Konzept bildet die Basis der vorliegenden Arbeit: Regionalisierungsprozesse im frühen Innenohrepithelium des Hühnchens wurden mit Hilfe von verschiedenen Manipulationen, wie Transplantation, Implantation und Explantation, untersucht. Zur Analyse der operierten Embryonen wurden dann neben morphologischen Kriterien die Aktivitätsmuster von Genen herangezogen, die Schlüsselfunktionen für unterschiedliche Aspekte der Innenohrmorphogenese besitzen.

4.1 Die Hühnchengene *cNkx5-1* und *Pax2* sind Orthologe von *Nkx5-1* und *Pax2* in der Maus.

Die murinen Homöobox-Transkriptionsfaktoren *Nkx5-1* und *Nkx5-2* (*Hmx3* und *Hmx2*) wurden in einem Homologiescreening nach Verwandten des *Drosophila*-Entwicklungsgens *NK1* identifiziert (Kim et al., 1989; Bober et al., 1994). Beide Gene besitzen eng begrenzte Expressionsdomänen im sich entwickelnden Gehirn und Innenohr, die auf ihre mögliche Funktion in der Entwicklung dieser Strukturen hinweisen (Bober et al., 1994; Rinkwitz-Brandt et al., 1995 und 1996). Mäuse, in denen *Nkx5-1/Hmx3* transgen inaktiviert wurde, zeigen einen durch Kreiseln und Gleichgewichtsstörungen charakterisierten Innenohrphänotyp, der auf einer fehlerhaften Morphogenese des vestibulären Systems beruht (Hadrys et al., 1998; Wang et al., 1998). Mitglieder der *Nkx5/Hmx*-Familie wurden aus verschiedenen Organismen, wie Mensch (Stadler et al., 1992 und 1995), Maus (Bober et al., 1994; Yoshiura et al., 1998), Hühnchen (Herbrand et al., 1998; Deitcher et al., 1994; Stadler et al., 1994), Seeigel (Martinez et al., 1997), *Drosophila* (Wang et al., 2000), Zebrafisch (Adamska et al., 2000) und *Medaka* (Adamska, 2001) isoliert.

Zwischen den verschiedenen Spezies erhaltene Expressionsmuster weisen auf eine evolutionär konservierte Funktion dieser Genfamilie in der Vertebratenentwicklung hin. Die genomische Organisation, Nukleinsäuresequenz und frühe, innenohrspezifische Expression des Hühnchengens *cNkx5-1* wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit beschrieben und weisen darauf hin, daß *cNkx5-1* das orthologe Hühnchengen zu Maus *Nkx5-1* darstellt (Herbrand, 1996 (Diplomarbeit); Herbrand et al.,

1998). Dabei war die cNkx5-1-Expression in späten Ohrvesikelstadien auf einen dorsolateralen Bereich beschränkt, aus dem in der weiteren Entwicklung nichtsensorische Komponenten des vestibulären Systems hervorgehen (Li et al., 1978). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expressionsanalyse im Innenohr auf zwei spätere Entwicklungsstadien, E7 (H.H.-Stadium 31) und E9 (H.H.-Stadium 35) ausgeweitet. Zu diesen Entwicklungsstadien sind die verschiedenen morphologischen Kompartimente des Innenohrs, die drei Bogengänge, der zentrale vestibuläre Hohlraum und der cochleäre Gang bereits weitgehend vollständig angelegt und sensorische Epithelien klar von nichtsensorischen Bereichen abgegrenzt (Bissonnette et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die cNkx5-1-Expression in beiden Entwicklungsstadien auf nichtsensorische Epithelien des vestibulären Systems beschränkt ist. In den sensorischen Epithelien und im cochleären Gang konnten hingegen keine cNkx5-1-Transkripte nachgewiesen werden. Damit gleicht die Expression von cNkx5-1 auch zu späteren Entwicklungsstadien der des Maus-Gens und kann als weiterer Hinweis auf eine evolutionär konservierte Funktion dieses Transkriptionsfaktors gewertet werden.

Ein zu Nkx5-1 komplementäres Muster zeigt der „paired“-Domänen Homöobox-Transkriptionsfaktor Pax2 (Nornes et al., 1990), dessen Transkripte auf ventrale Anteile des Innenohrs, Sacculus und Cochlea, beschränkt sind. Die Ausschaltung von Pax2 in der Maus führt zur Agenesie der Cochlea und zeigt, daß Pax2 ein wichtiges Kontrollgen für die Morphogenese auditiver Strukturen ist (Torres et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster des Hühnchen-Pax2-Gens in frühen und späten Stadien der Ohrentwicklung untersucht. Wie in der Maus wird Pax2 im Hühnchen entlang der gesamten Länge der Ohrplakode und im benachbarten Oberflächenektoderm aktiviert. Mit der Ausbildung des Ohrvesikels werden die Transkripte auf den dorsomedialen Vesikelabschnitt regionalisiert (Herbrand et al., 1998). Ein ähnlicher Verlauf der frühen Pax2-Expression im Innenohr des Hühnchens wurde auch von Matías Hidalgo-Sánchez und Kollegen bestimmt (Hidalgo-Sánchez et al., 2000). Von Mary R. Hutson und Kollegen wurde der Verlauf der Pax2-Proteinverteilung im Hühnchen untersucht und eine Regionalisierung des Pax2-Proteins im H.H.-Stadium 16 an der dorsalen und entlang der gesamten medialen Seite des Ohrvesikels nachgewiesen (Hutson et al., 1999). In der Maus sind Pax2-Transkripte zu vergleichbaren Entwicklungsstadien hingegen auf den ventromedialen Vesikelabschnitt konzentriert (Nornes et al., 1990; Rinkwitz-Brandt et al., 1995 und 1996). Zu späteren Stadien (E7 und E9) der Embryonalentwicklung konnte das Pax2-Protein dann jedoch, wie für die Maus beschrieben, im cochleären Gang und in ventralen Aspekten des Sacculus nachgewiesen werden, so daß die Expressionsdomänen, abgesehen von den geringen räumlichen Unterschieden im Ohrvesikelstadium, zwischen beiden Spezies konserviert zu sein scheinen.

4.2.1 Aspekte der frühen Innenohrmorphogenese werden in ektopischen Positionen nachvollzogen.

Schon seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts dient das Innenohr als Modellsystem zur Untersuchung induktiver Prozesse im Vertebratenembryo. Fragen nach der Herkunft ohrinduzierender Signale, dem zeitlichem Verlauf von Induktion und ektodermaler Kompetenz und den räumlichen Erfordernissen für die Ausbildung des Ohrvesikels wurden zunächst in verschiedenen Amphibienspezies und im Hühnchen, später dann auch in der Maus studiert (Van De Water et al., 1991). In Abhängigkeit vom verwendeten Modellsystem und technischen Details der Versuchsdurchführung wurden dabei zum Teil höchst widersprüchliche Aussagen getroffen. Stark vereinfacht lassen die Ergebnisse der meisten Studien die Schlußfolgerung zu, daß die Ausbildung eines normalen Innenohrs schrittweise verläuft und aus dem Zusammenspiel von prospektivem Ohrektoderm mit prächordalem Mesoderm und Neuroektoderm resultiert. Dabei konnte eine frühe Phase ohrinduzierender Signale aus dem Mesoderm identifiziert werden, die mit späteren Signalen neuroektodermalen Ursprungs überlappt (Harrison, 1945; Yntema, 1955; Jacobsen, 1966). Da sowohl Mesoderm als auch Hinterhirn allein in der Lage sind Ohrplakoden zu induzieren, scheinen beide Signale in gewissem Umfang redundant zu sein (Harrison, 1945). Für einen normalen Fortgang der Morphogenese über das Plakodenstadium hinaus ist jedoch ein kontinuierlicher neuroektodermaler Einfluß erforderlich (Jacobsen, 1963).

Größere Diskrepanzen zwischen den einzelnen Studien ergeben sich in der Frage, von welchem Stadium an Ohrplakoden determiniert sind und sich autonom von äußeren Einflüssen entwickeln können. Für den Frosch *Rana pipiens* konnte gezeigt werden, daß die Ohrplakode sich weiterentwickeln kann, wenn sie im späten Blastoporen- oder frühen Neuralplattenstadium in die posteroventrale Flanke transplantiert wird (Zwilling, 1941). In Salamanderembryonen der Art *Amblystoma punctatum* scheint ein vergleichbarer Grad an epithelialer Autonomie hingegen erst im späten Neurulastadium (Yntema, 1939), in Hühnchenembryonen erst im Ohrgrubenstadium (Waddington, 1937) und in Mausembryonen sogar erst einen Tag nach der Formierung des Vesikels (Van De Water et al., 1991) erreicht zu sein. Obgleich die einzelnen Daten schwer vergleichbar erscheinen, werden sie von einigen Autoren als Hinweis auf eine heterochronische Verschiebung im Erwerb epithelialer Autonomie angesehen, der mit der Höherentwicklung der Arten einhergeht (Fritsch et al., 1998). Insgesamt wird die Glaubwürdigkeit der vorgestellten Arbeiten jedoch teilweise durch das Fehlen von Kontrolloperationen, aber auch durch mangelnde sprachliche Präzision in der Verwendung von Begriffen wie „Induktion“, „Kompetenz“, „Spezifizierung“ oder „Determinierung“ stark eingeschränkt. Erst die Identifizierung einer Vielzahl ohrspezifisch exprimierter Gene während der letzten 20 Jahre (Übersichtsartikel von Fritsch et al., 1998 und Torres et al., 1998) erlaubt es, Begriffe wie „Plakodenstatus“, „Kompetenz“, „Induktion“ oder „Regionalisierung“ über morphologische Kriterien hinaus molekular zu definieren.

Um Morphogenese und Musterbildung in der Ohrplakode zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit „klassische“ Transplantationsexperimente mit der Analyse von Genen, die unterschiedliche Aspekte der Ohrentwicklung kontrollieren, kombiniert. Diese Experimente zeigten, daß einerseits das Alter der transplantierten Ohrplakoden und andererseits der Zielort des transplantierten Gewebes einen entscheidenden Einfluß auf deren Fähigkeit hatten, sich ektopisch zu entwickeln.

Im Gegensatz zu frühen Experimenten von C. N. Waddington (Waddington, 1937) konnte durch die hier durchgeführten Transplantationen demonstriert werden, daß auch junge Ohrplakoden vor H.H.-Stadium 10 in der Lage sind, sich in einer permissiven ektopischen Umgebung zum Ohrvesikel zu schließen. Ein solches permissives Umfeld stellen zum Beispiel das rostrale Hinterhirn und das Mittelhirn dar, wo sich 64% der transplantierten Plakoden zu Ohrvesikeln schließen konnten. Diese Vesikel blieben jedoch sphärisch und zeigten keine Anzeichen weiterer Morphogenese. Auf der Höhe der Somiten 3/4 oder im Mesenchym der Flügelknospen entwickelten sich junge Ohrplakoden hingegen, ähnlich wie die von C. H. Waddington ins amniokardiatische Vesikel transferierten Plakoden, nicht zum Vesikel weiter. Somit kann man postulieren, daß Ohrplakoden bereits im 6-9 Somitenstadium, kurz nachdem sie morphologisch vom umliegenden Oberflächenektoderm unterscheidbar sind, zu einem gewissen Grade in ihrer Entwicklung festgelegt sind und sich in einem permissiven oder instruktiven Umfeld zum Ohrvesikel weiterentwickeln können. Bestätigt wird diese Hypothese durch eine kürzlich erschienene Studie, in der durch *in vitro* Kultivierung von isoliertem Plakodenektoderm und Analyse von vier früh in der Ohranlage exprimierten Genen, Pax2, Sox-3, BMP7 und Notch gezeigt wurde, daß kraniales Ektoderm im Hühnchen bereits im 4-6 Somitenstadium zur Ausbildung der Ohrplakode spezifiziert wird (Groves et al., 2000).

Dieser Prozeß ist jedoch keine „alles-oder-nichts“-Entscheidung sondern verläuft in Stufen. Das zeigt ein Vergleich mit den Ergebnissen der Transplantation älteren Ohrplakodenektoderms: H.H.-Stadium 10-12 Embryonen entnommenes Ohrgewebe konnte sich nach rostraler Transplantation stets zu Ohrvesikeln zusammenschließen, die meistens genauso groß wie die endogenen Vesikel waren. Als Zeichen einer weitergehenden Entwicklung bildete sich an ihrer dorsomedialen Seite eine Ausstülpung, die dem Primordium des endolymphatischen Gangs ähnelte. Somit scheint das Plakodenektoderm zu diesem späteren Stadium vollständiger auf ein „normales“ Programm der Innenohrentwicklung festgelegt zu sein.

Für die Entwicklung des transplantierten Plakodenektoderms ist außer dem Alter des transplantierten Gewebes vor allem auch der Implantationsort im Wirtsembryo von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten der Plakoden in drei verschiedenen ektopischen Positionen untersucht. Im späten Plakodenstadium (H.H.-Stadium 10-12) transplantiertes Ektoderm entwickelte sich in der rostralen Position stets zum Vesikel und bildete häufig ein ED-Primordium aus. In der weiter kaudalen Position auf Höhe der Somiten 3/4 konnte trotz direkter Nachbarschaft der Neuralachse lediglich der Zusammenschluß zum Vesikel und bei

Transplantation ins Flügelknospenmesenchym keinerlei Weiterentwicklung des Transplantats beobachtet werden. Auch von Swanson und Mitarbeitern wurde das Entwicklungspotential von Innenohrektoderm des Hühnchens in den Flügelknospen untersucht. Eine Weiterentwicklung des Transplantats und die Differenzierung zu verschiedenen innenohrspezifischen Zelltypen erfolgte nur dann, wenn die Operation nach H.H.-Stadium 13 durchgeführt wurde (Swanson et al., 1990). Im Einklang damit wurde von C. Waddington gezeigt, daß sich erst nach H.H.-Stadium 10 ins amniokardiatische Vesikel transferierte Hühnchenohrplakoden zum Vesikel weiterentwickelten (Waddington, 1937). Dahingegen wurde von A. K. Groves beschrieben, daß sich Ohrplakoden, die im H.H.-Stadium 10 in die laterale Rumpfreion gleichalter Wirtsembryonen transferiert wurden, in fast allen untersuchten Fällen zum Vesikel zusammenschlossen. Diese Vesikel waren positiv für Pax2, exprimierten diesen Marker jedoch auf geringerem Level als im endogenen Ohrepithel (Groves et al., 2000). Der auffälligste Unterschied zwischen den präsentierten Experimenten liegt im Alter der Wirtsembryonen. So könnte man postulieren, daß das laterale Rumpfmesoderm isochroner Wirtsembryonen ein neutrales Umfeld darstellt, das die Weiterentwicklung spezifizierten Ohrektoderms zuläßt, während das Flügelknospenmesenchym älterer Wirtsembryonen diese durch inhibitive Signale unterbindet. Ohrplakoden im 10 Somitenstadium müßten infolge dieser Hypothese, anders als von A. K. Groves vorgeschlagen, als spezifiziert aber nicht determiniert angesehen werden, da sie sich nicht unabhängig von ihrem lokalen Umfeld weiterentwickeln können.

Die Hypothese, daß frühe Schritte der Innenohrmorphogenese auch ohne den Einfluß der benachbarten Rhombomere 5/6 ablaufen können, wird dadurch unterstützt, daß in mehreren Hinterhirnmutanten der Maus, wie etwa *Kreisler*- oder *Hoxa-1* defizienten Mäusen, die Ausbildung von Ohrplakode und sphärischem Ohrvesikel nicht betroffen ist (Mark et al., 1993; Frohman et al., 1993; McKay et al., 1994; Cordes et al., 1994). Die in beiden Mausmutanten im Vesikelstadium arretierte Ohrmorphogenese und die hier vorgestellten Transplantationsstudien demonstrieren aber auch, daß die Ausbildung der morphologischen Kompartimente und der komplexen dreidimensionalen Struktur des Innenohrs auch zu späteren Entwicklungsstadien noch Wechselwirkungen mit der engen lokalen Umgebung erfordert. So kam es bei einer auf vier Tage verlängerten Inkubation der operierten Embryonen in keiner der untersuchten ektopischen Positionen zu einem normalen Fortschreiten der Morphogenese. Ein Primordium für den endolymphatischen Gang war das einzige Anzeichen weiterreichender Morphogenese, das in einigen ektopischen Ohrvesikeln im rostralen Hinterhirn oder Mittelhirn gebildet wurde. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, daß der endolymphatische Gang als erstes morphologisches Kompartiment des Innenohrs bereits im späten Ohrplakodenstadium (H.H.-Stadium 10-12) determiniert wird. Rotationsexperimente an Hühnchenembryonen, bei denen Innenohrepithelien im späten Ohrgruben- oder frühen Ohrvesikelstadium (H.H.-Stadium 15-18) um 180° gedreht an ihrer ursprünglichen Position reinseriert wurden, unterstützen diese Vermutung. Diese Operation

resultierte nach zehntägiger Inkubation in Innenohren, in denen der endolymphatische Gang an seiner ursprünglichen Position gebildet wurde. Alle anderen Kompartimente entwickelten sich jedoch gemäß der veränderten Orientierung und waren stark mißgebildet (Hutson et al., 1999). Auch die oben bereits erwähnten Transplantate von Ohrgrubenektoderm im H.H.-Stadium 13 in die Flügelknospen zeigten trotz Differenzierung der verschiedenen innenohrspezifischen Zelltypen nicht ihre normale dreidimensionale Anordnung (Swanson et al., 1990). Kaudale Hinterhirnbereiche in Hühnchenembryonen im H.H.-Stadium 11-13 wurden im Labor von Kate F. Barald uni- oder bilateral ablatiert, um den Einfluß der Rhombomere 5/6 auf spätere Prozesse der Innenohrmorphogenese zu studieren. Die operierten Embryonen wurden bis zum Embryonaltag 10 inkubiert, an dem alle Kompartimente des Innenohrs angelegt sind. Dabei resultierte vor allem die beidseitige Ablation in strukturell stark deformierten und trunkierten Innenohren, in denen Bogengänge nicht oder nur ansatzweise ausgebildet wurden und der zentrale Hohlraum keine Trennung in Sacculus und Utriculus erkennen ließ. Die Entwicklung des cochleären Gangs verlief hingegen weitgehend normal (Hutson et al., 1999). Diese Experimente zeigen, daß die Entwicklung vestibulärer Strukturen stärker von Wechselwirkungen mit dem Hinterhirns abhängig ist als die der Cochlea.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten und in der Literatur beschriebenen Experimente, daß Innenohrektoderm bereits im frühen Plakodenstadium, vor H.H.-Stadium 10, spezifiziert zu sein scheint und sich in einem permissiven Umfeld, wie in der Kopfreion, nicht aber im amniokardiatischen Vesikel (Waddington, 1937) oder in den Flügelknospen (Swanson et al., 1990, Herbrand et al., 1998) weiterentwickeln kann.

4.2.2 cNkx5-1 kann in Ohrplakodentransplantaten entlang der Neuralachse aktiviert werden.

Die frühe Nkx5-1-Expressionsdomäne in Ohrplakode und Ohrgrube grenzt unmittelbar an das Neuroepithelium des Hinterhirns an. Daher lag es nahe zu untersuchen, ob die transkriptionelle Aktivierung des cNkx5-1-Gens oder die Aufrechterhaltung seiner Expression von Signalen aus dem Hinterhirn abhängen. Die durchgeführten Transplantationsexperimente ergaben deutliche Unterschiede in der Expression des cNkx5-1-Gens in Abhängigkeit vom Alter des transplantierten Ektoderms und der Implantationsstelle im Wirtsembryo. Das endogene Expressionsmuster konnte, wie auch Aspekte der Ohrmorphogenese, in weiter rostralen Positionen am ehesten rekonstituiert werden. Nach Transplantation im H.H.-Stadium 8-9 konnte cNkx5-1-Expression in 50% der resultierenden ektopischen Vesikel aktiviert werden. Wurde das Ohrektoderm dagegen in H.H.-Stadium 10-12 transplantiert, so wurde die Expression in allen resultierenden ektopischen Vesikeln aufrecht erhalten. Interessanterweise entsprach die Lokalisierung der cNkx5-1-Transkripte in den

ektopischen Vesikeln stets der endogenen Situation, obwohl die Plakoden in zufälliger Orientierung in die Wirtsembryonen inseriert wurden. Daher muß man fordern, daß in der rostralen Hinterhirn- und Mittelhirnregion Signale vorhanden sind, die zur korrekten Aktivierung von cNkx5-1 auf der lateralen Vesikelseite führten, bzw. die cNkx5-1-Domäne auf diesen Abschnitt zurückdirigierten, wenn die Plakoden nach dem 10 Somitenstadium transplantiert wurden. Dieser Musterbildungsprozess könnte entweder darauf beruhen, daß Signale aus der rostralen Kopfregion einen direkten Einfluß auf die cNkx5-1-Expression haben oder indirekt, über die Aktivierung anderer Signalmoleküle oder Transkriptionsfaktoren innerhalb des Ohrektoderms, Lage und Größe der cNkx5-1-Domäne bestimmen. Interessanterweise wurde die korrekte Lokalisierung der cNkx5-1-Transkripte nur bei Transplantaten in weiter rostrale Positionen, nicht aber bei Transplantationen nach weiter posterior auf die Höhe der Somiten 3/4 beobachtet, obwohl auch hier der Insertionsort der Neuralachse unmittelbar benachbart war. In dieser ektopischen Position wurde die cNkx5-1-Aktivität zwar aufrecht erhalten, jedoch entsprachen weder Signalintensität noch Transkriptverteilung der endogenen Situation. In die Flügelknospen transferiertes Ohrektoderm zeigte nur eine schwache und diffuse cNkx5-1-Expression. Insofern scheinen weiter posterior gelegene Regionen des Embryos ein sowohl für die Innenohrmorphogenese als auch die cNkx5-1-Expression weniger instruktives oder permissives Umfeld darzustellen als die Kopfregion. Die durchgeführten Experimente lassen vermuten, daß Aktivierung und Lokalisierung der cNkx5-1-Expression möglicherweise durch externe Signale erfolgen, die nur in der Kopfregion präsent sind. Dahingegen kann die cNkx5-1-Aktivität auch durch intrinsische Signale innerhalb des Ohrepithels oder autokrin aufrecht erhalten werden. Unterstützt wird diese Idee auch durch die Ergebnisse der durchgeführten Explantationsexperimente. Hier wurde Innenohrektoderm im späten Ohrgrubenstadium, also deutlich nach der Aktivierung des cNkx5-1-Gens, zusammen mit oder isoliert von den umliegenden Geweben *in vitro* kultiviert. Dabei wurde die cNkx5-1-Genaktivität auch im isoliert kultivierten Ohrektoderm aufrecht erhalten, die cNkx5-1-Domäne war jedoch breiter und diffuser begrenzt als nach Kultivierung zusammen mit den umgebenden Geweben.

4.2.3 Pax2-Transkript werden in ektopischen Vesikeln nicht regionalisiert.

Interessanterweise schien Pax2, ein Kontrollgen für die Entwicklung auditiver Innenohrstrukturen, in stärkerem Maße von lokalen Signalen abhängig zu sein als cNkx5-1. Während alle ektopischen Vesikel, bei denen das Plakodenektoderm nach dem 10-Somitenstadium transplantiert wurde, cNkx5-1 positiv waren und das normale, regionalisierte Expressionsmuster zeigten, wies nur ungefähr die Hälfte der Embryonen in den endogenen und ektopischen Ohrvesikeln das gleiche

Level an Pax2-Aktivität auf. Die Pax2-Signale in den übrigen ektopischen Vesikeln waren dagegen stets schwächer als in den korrespondierenden endogenen Kontrollen. Die spezifische Pax2-Transkriptverteilung in der medialen Vesikelwand wurde ektopisch in keinem Fall nachgebildet. Zur Beantwortung der Frage, welcher Mechanismus den beobachteten Unterschieden im Verhalten von cNkx5-1 und Pax2 zugrunde liegt, könnte es von Bedeutung sein, daß beide Gene in die Morphogenese unterschiedlicher Innenohrkompartimente involviert sind. In der Maus ist die Pax2-Genaktivität für das Auswachsen der Cochlea erforderlich (Torres et al., 1996), während Nkx5-1 die Ausbildung der Bogengänge reguliert (Hadrys et al., 1998; Wang et al., 1998). So erscheint es durchaus möglich, daß die Ausbildung von vestibulären und auditorischen Strukturen des Innenohrs durch unterschiedliche Signalwege gesteuert wird und beide Kompartimente sich weitgehend unabhängig voneinander entwickeln. Ein solches Konzept wurde auch von anderen postuliert (Fekete, 1996).

Im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Transplantationsexperimenten sollten außerdem Arbeiten aus zwei weiteren Arbeitsgruppen erwähnt werden, in denen ebenfalls die Reaktion des Hühnchen Pax2-Gens auf verschiedene Transplantations- und Implantationsexperimente analysiert wurde (Hutson et al., 1999; Vendrell et al., 2000). In der Arbeitsgruppe von Thomas Schimmang wurde gezeigt, daß in Hühnchenembryonen, die im 4-12 Somitenstadium mit einem FGF3-Expressionskonstrukt infiziert wurden, ektopische Innenohrplakoden und Vesikel ausgebildet wurden. Diese ektopisch induzierten Ohrvesikel zeigten eine normale Regionalisierung aller untersuchten Markermoleküle, unter anderem auch von cNkx5-1 und Pax2 (Vendrell et al., 2000). Die beobachteten Unterschiede könnten dadurch zu erklären sein, daß im Fall der ektopisch induzierten Vesikel das vollständige intrinsische Programm für die Innenohrentwicklung aktiviert wird. Dahingegen könnten bei den in meiner Arbeit durchgeführten Transplantationen durch den Transfer der Plakode interne Komponenten des Genexpressionsprogramms verloren gehen, die z.B. für die Regionalisierung der Pax2-Transkripte benötigt werden. Trotz der Unterschiede in Bezug auf die Pax2-Expression zeigten das FGF3-induzierte und das in ektopische Positionen transplantierte Innenohrektoderm in vielerlei Hinsicht ein ähnliches Verhalten. Ohrplakoden konnten durch Infektion mit dem viralen FGF3-Konstrukt nur in einem anterioren Bereich, zwischen Augenanlage und dem sechsten Somiten, induziert werden. Eine Infektion im Rumpfbereich führte dagegen nicht zur Ausbildung ektopischer Ohrplakoden (Vendrell et al., 2000). Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen der von mir durchgeführten Transplantationen und zeigt, daß nur anteriores embryonales Ektoderm eine Kompetenz besitzt, auf ohrinduzierende Signale zu reagieren und ein für die Ohrentwicklung permissives Umfeld darstellt. Gemessen an der korrekten Lokalisierung aller untersuchten Marker (Pax2, Nkx5-1, cck-8, Imx-1, BMP7 und β -Tubulin) scheinen FGF3-induzierte Ohrvesikel zunächst ihr vollständiges, intrinsisches Entwicklungsprogramm zu besitzen. Trotzdem führte eine verlängerte Inkubation, wie auch im Fall der hier vorgestellten Ohrplakodentransplantationen, nicht zu einem normalen

Fortschreiten der Innenohrmorphogenese und der Ausbildung distinkter morphologischer Kompartimente sondern zum Verlust der Markergenexpression und Blockierung der Morphogenese im Vesikelstadium (Vendrell et al., 2000).

Im Labor von Kate F. Barald wurden ebenfalls Transplantationsexperimente zur funktionellen Untersuchung des Hühnchen Pax2-Gens in Musterbildungsprozessen des Innenohrs durchgeführt (Hutson et al., 1999). Im späten Ohrplakoden- oder Ohrgrubenstadium (H.H.-Stadium 11-13) durchgeführte Ablationen des kaudalen Hinterhirns resultierten in der Ausbildung kleinerer Ohrvesikel mit homogener, nicht regionalisierter Pax2-Expression. Diese Ergebnisse weisen auf einen Einfluß dieses Hinterhirnbereichs auf die Regionalisierung der Pax2-Transkripte hin, wie er auch aufgrund der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transplantationsstudien postuliert werden muß. Im Ohrvesikelstadium umfaßt die Pax2-Expression sowohl den dorsalen Bereich des Epitheliums, aus dem endolymphatischer Gang (ED) und Sack (ES) hervorgehen, als auch den medialen Bereich, der die Anlage auditiver Strukturen darstellt. In diesen Stadien (H.H.-Stadien 15-20) durchgeführte Rotationen des Ohrvesikels führten innerhalb von 18 Stunden nach der Operation zu einer Umverteilung der Pax2-Transkripte in medialen Vesikelabschnitten, während die Pax2-Expression im dorsalen Teil des Vesikels kein plastisches Verhalten zeigte. Wurden die Vesikel im gleichen Entwicklungsstadium in das Lumen des Hinterhirns auf Höhe der Rhombomere 5/6 transferiert, wurde im differenzierenden ED und ES ein hohes Pax2-Transkriptionsniveau aufrecht erhalten, während die Pax2-Aktivität in anderen Vesikelbereichen unter das endogene Level absank. Da diese Experimente ein späteres Zeitfenster der Innenohrentwicklung adressieren, können die Ergebnisse nicht direkt mit den von mir durchgeführten Transplantationen verglichen werden. Sie zeigen jedoch, daß die Lokalisierung der Pax2-Transkripte in medialen Teilen des Vesikels selbst im Ohrvesikelstadium noch stark von lokalen Signalen abhängig ist. Die Tatsache, daß sich Pax2 im ED und ES nicht plastisch verhielt, korreliert mit unseren Beobachtungen, daß der ED die einzige Innenohrstruktur war, die ansatzweise an ektopischen Positionen im Embryo ausgebildet werden konnte, und weist auf eine frühe Festlegung dieses Kompartiments hin.

Explantationstudien zeigten, daß Aspekte der Cochlea-Entwicklung weitaus vollständiger autonom ablaufen können als die Morphogenese vestibulärer Strukturen (Van De Water et al., 1991). Betrachtet man als Arbeitshypothese Nkx5-1 als Kontrollgen für die Morphogenese der Bogengänge und Pax2 als Schlüsselmolekül für die Ausbildung der Cochlea, so ist es erstaunlich, daß lokale Signale die Pax2-Expression stärker beeinflussten als die von Nkx5-1. Daher ist es möglicherweise zu stark vereinfachend, von der Aktivität einzelner Moleküle auf komplexe Prozesse wie die Morphogenese eines Innenohrkompartmentes zu schließen. Weitere Gene, die an der Entwicklung vestibulärer bzw. auditiver Strukturen beteiligt sind, sollten deshalb in die Analyse der Manipulationen einbezogen werden. Geeignete Moleküle mit Aktivität in vestibulären Abschnitten des Ohrepithels wären zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren Dlx5, Otx1 und Otx2,

Prx1 und Prx2 sowie das sekretierte Protein netrin1. Ihr Ausfall resultiert in unterschiedlich schwerwiegenden Mißbildungen der Bogengänge (Dlx5: Acampora et al., 1999; Depew et al., 1999; netrin1: Salminen et al., 2000; Otx1 und Otx2: Acampora et al., 1996; Cantos et al., 2000; Prx1 und Prx2: ten Berge et al., 1998). Als weitere Gene, die an der Entwicklung der Cochlea beteiligt sind, könnten zusätzlich die Transkriptionsfaktoren Brn4/Pou3f4 und neurogenin1 untersucht werden, deren Inaktivierung zu einer Verkürzung des cochleären Gangs führt (Brn4/Pou3f4: Phippard et al., 1999; neurogenin1: Ma et al., 1998).

4.2.4 BMP4, ein Marker prospektiver Sinnesepithelien, zeigt kein plastisches Verhalten.

Das Signalmolekül BMP4 wird in allen Sinnesepithelien des Hühncheninnenohrs exprimiert, bevor sich diese morphologisch von den umgebenden nichtsensorischen Bereichen unterscheiden. Die Analyse der BMP4-Transkriptverteilung in ektopischen Ohrvesikeln zeigte, daß das für das frühe Ohrvesikelstadium charakteristische Muster mit zwei eng begrenzten BMP4-positiven Foci in ektopischen Vesikeln sowohl in der Kopfreion als auch auf Höhe der Somiten 3/4 aufrecht erhalten wurde. Diese Foci fanden sich in den ektopischen Vesikeln jedoch nicht, wie in der endogenen Situation, am anterioren und posterioren Vesikelpol sondern schienen bezüglich der embryonalen Achsen zufällig orientiert zu sein. Da die Ohrplakoden bei der Transplantation in einer zufälligen Orientierung in die Wirtsembryonen implantiert wurden, scheinen die BMP4-exprimierenden prospektiven Sinnesepithelien bereits vor der Transplantation spezifiziert zu sein und erhielten deshalb ihr Muster in den ektopischen Vesikeln aufrecht. In der Entwicklungsperiode nach der Transplantation scheinen daher weder intrinsische Signale innerhalb des Ohrektoderms noch äußere Signale aus dem ektopischen Umfeld wirksam zu sein, die zu einer Respezifizierung der Sinnesepithelien gemäß der veränderten Orientierung und damit zu einem plastischen Verhalten des BMP4-Gens führen würden. Ein ähnliches, diese Schlußfolgerung unterstützendes Verhalten des BMP4-Gens wurde auch beobachtet, wenn Innenohrektoderm im späten Ohrgrubenstadium explantiert und für 20 oder 40 Stunden *in vitro* kultiviert wurde. Auch dann blieb die BMP4-Expression auf die charakteristischen, eng begrenzten Foci beschränkt und in ihrer Intensität unverändert, unabhängig davon, ob das Ektoderm isoliert oder zusammen mit den umgebenden Geweben inkubiert wurde. Das grundsätzlich unterschiedliche Verhalten von BMP4, cNkx5-1 und Pax2 infolge der Transplantation deutet darauf hin, daß die Differenzierung zwischen sensorischen und nicht-sensorischen Innenohrepithelien ein deutlich früherer Prozeß ist als die Festlegung der Identitäten der verschiedenen Innenohrkompartimente und daß beide Prozesse weitgehend unabhängig voneinander ablaufen. Eine solche Abfolge der Zellschicksalsentscheidungen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen postuliert (Fekete, 1996).

und später durch Achsenrotationsexperimente bestätigt (Wu et al., 1998). Dazu wurden frühe Ohrvesikel im H.H.-Stadium 16-17 bezüglich der verschiedenen embryonalen Achsen rotiert und die operierten Hühnchenembryonen bis zum Embryonaltag 9 weiterinkubiert. Die resultierenden Innenohren zeigten deutlich, daß die anterior-posteriore Achse der sensorischen Organe im frühen Vesikelstadium bereits festgelegt ist. Im Gegensatz dazu verhielten sich nichtsensorische Epithelien auch im Vesikelstadium noch plastisch (Wu et al., 1998).

4.2.5 SOHo, ein Mitglied der Nkx5-Homöoboxgenfamilie, zeigt ein anderes Verhalten als cNkx5-1.

Aufgrund ihrer hohen Homologie innerhalb der Homöodomäne und carboxyterminal davon gelegenen Sequenzbereichen und Übereinstimmungen im Expressionsmuster müssen cNkx5-1 und SOHo als Mitglieder derselben, als Nkx5- oder Hmx-Familie angesprochenen, Genfamilie angesehen werden (Deitcher et al., 1994; Adamska, 2001). Da überraschenderweise bislang kein Mausortholog des SOHo-Gens beschrieben wurde, kann über die differentiellen Funktionen von cNkx5-1 und SOHo in der Innenohrentwicklung nur spekuliert werden. Eine detaillierte Expressionsstudie des SOHo-Gens und eines weiteren Mitglieds der Nkx5-Genfamilie, GH6, weist auf eine Beteiligung beider Gene in der Morphogenese der Bogengänge hin (Kiernan et al., 1997), wie sie für Nkx5-1/Hmx3 bereits gezeigt werden konnte (Hadrys et al., 1998; Wang et al., 1998). Die Aktivierung von SOHo und cNkx5-1 erfolgt an entgegengesetzten Polen der Ohrplakode, während ihre Expression in späteren Phasen der Innenohrmorphogenese stark überlappt. Ein Vergleich der Reaktion von cNkx5-1 und SOHo auf die Transplantation von Ohrektoderm sollte weitere Hinweise darauf geben, inwieweit beide Gene in der Morphogenese des Innenohrs unterschiedliche, sich ergänzende oder redundante Funktionen ausüben. Trotz ihrer Strukturverwandtschaft zeigten beide Gene eine unterschiedliche Reaktion auf die durchgeführten Manipulation: Während das endogene cNkx5-1-Muster in ektopischen Vesikeln in der Kopfreion rekonstituiert wurde, konnte SOHo-Aktivität in ektopischen Ohrvesikeln zwar aktiviert bzw. aufrecht erhalten werden, zeigte jedoch weder in Bezug auf Signalintensität noch auf die Größe der Expressionsdomäne oder die Verteilung der Transkripte ein ähnliches Verhalten wie in der endogenen Situation. Interessanterweise wurde kürzlich eine Zellschicksalsstudie durchgeführt, bei der die Bewegungen verschiedener Zellgruppen der Ohrgrube während der Ausbildung des geschlossenen Vesikels durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff untersucht wurden. Hier konnte gezeigt werden, daß Zellen aus dem posteroventralen Abschnitt der Ohrgrube, der positiv für SOHo aber nicht cNkx5-1 ist, den Ursprung der gesamten lateralen Vesikelhälfte bilden (Brigande et al., 2000a und 2000b). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß SOHo kontinuierlich in Zellen desselben Ursprungs aktiv ist, die durch Zellwanderungen an unterschiedliche Positionen

innerhalb des Ohrepithels gelangen. Der diskontinuierliche Verlauf der cNkx5-1-Expression beim Übergang von der Ohrgrube zum Ohrvesikel kann dagegen nicht als Folge der Zellbewegungen erklärt werden. Daher muß die Nkx5-1-Domäne im Ohrvesikel neu definiert werden. Das könnte darauf hinweisen, daß Nkx5-1 in den verschiedenen Phasen der frühen Innenohrentwicklung, zunächst in der Ohrplakode und später im Ohrvesikel unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Die Existenz eines solchen, möglicherweise von außen auf das Ohrepithelium einwirkenden, Signals könnte auch die beschriebenen Unterschiede in der Expression von cNkx5-1 und SOHo infolge der Transplantation erklären. Ein auf cNkx5-1 nicht aber auf SOHo einwirkendes Signal im rostralen Kopfbereich des Embryos könnte dazu führen, daß die cNkx5-1-Domäne auch in weiter rostralen Positionen auf die laterale Vesikelseite dirigiert wird. Das SOHo-Gen würde aufgrund fehlender Lokalisierungssignale hingegen kein einheitliches Muster in der ektopischen Position zeigen.

Möglicherweise tragen alle Mitglieder der Nkx5-Genfamilie synergistisch zur Kontrolle der Bogengangentwicklung bei und erfüllen dabei teils redundante teils aber auch voneinander abweichende oder sich ergänzende Funktionen. Der gegenüber der Nkx5-1/Hmx3-Einzelmutante drastisch verstärkte Ohrphänotyp in Hmx2/Hmx3-Doppelmutanten (T. Lufkin, persönliche Mitteilung) unterstützt die Vermutung, daß gerade die geringen Differenzen in den räumlich zeitlichen Aktivitätsmustern verschiedener Nkx5-Gene zur Feinabstimmung in der Morphogenese der Bogengänge beitragen könnten.

Eine eigene Unterfamilie der Nkx5-Gene wird vom Mausgen Hmx1, dem Hühnchengen GH6 und dem *Medaka*-Gen *OlNkx5-1* gebildet (Adamska 2001; Yoshiura et al., 1997; Stadler et al., 1994). Interessanterweise werden weder das Maus- noch das Fischgen während der Innenohrentwicklung exprimiert (Adamska 2001; Yoshiura et al., 1997). Dahingegen zeigt das orthologe Hühnchengen GH6 eine markante Expression im Ohrepithelium, die in allen Entwicklungsstadien der des SOHo-Gens gleicht (Kiernan et al., 1997). Zur weiteren Aufklärung der differentiellen Funktionen der drei Nkx5-Gene für die Innenohrmorphogenese im Hühnchen wäre es interessant, vergleichend zu cNkx5-1 und SOHo auch die Reaktion von GH6 auf die Transplantation von Ohrektoderm zu untersuchen.

4.3 Insertion einer Goldbarriere zwischen Hinterhirn und Ohrplakode führt möglicherweise zu einer Neuinduktion von Innenohrektoderm.

Die Lokalisation der cNkx5-1-Transkripte auf der lateralen Seite endogener und ektopischer Ohrvesikel führte zu der Vermutung, daß möglicherweise inhibitive Signale aus dem Neuroektoderm die cNkx5-1-Aktivität in medialen Bereichen des Vesikels unterdrücken und so zu einer Eingrenzung der Expressionsdomäne auf den lateralen Abschnitt führen könnten. Diese Vermutung wurde experimentell durch Veränderungen des räumlichen Verhältnisses zwischen

Neuroektoderm und Ohrektoderm überprüft: Zunächst, indem die Ohrplakode zusätzlich lateral von Neuroektoderm flankiert wurde und umgekehrt, indem der Kontakt beider Gewebe durch Insertion einer Barriere unterbunden wurde. Da weder das ektopische Neuroektoderm zu einer Verkleinerung der cNkx5-1-Domäne noch die Insertion der Goldbarriere zu deren Ausweitung führte, konnte die den Experimenten zugrundeliegende Hypothese nicht bestätigt werden.

Trotzdem sollen im Folgenden einige Aspekte beider Manipulationen ausführlicher diskutiert werden. Nach Implantation der Goldbarrieren wurden zwei auffällige Effekte beobachtet: Zum einen war das Ohrvesikel auf der operierten Seite in etwa 75% der analysierten Embryonen nach zweitägiger Inkubation deutlich kleiner als das Vesikel auf der kontralateralen Seite. Zum anderen wurden in mehr als der Hälfte der Embryonen auf der operierten Seite zwei Ohrvesikel ausgebildet, eines medial und eines lateral der Goldbarriere. Dabei konnten cNkx5-1-Transkripte stets nur im lateral der Goldbarriere geformten Vesikel nachgewiesen werden. Eine Reduktion der Vesikelgröße infolge gestörter Wechselwirkungen zwischen Hinterhirn und Ohrplakode weist darauf hin, daß das Hinterhirn Wachstum und Zellproliferation im Innenohrephelium stimuliert. Ein solcher trophischer Effekt korreliert mit der Vergrößerung des Ohrvesikels nach Insertion von zusätzlichem Neuroepithelium ventrolateral der Ohrplakode und wurde auch bereits an anderer Stelle beschrieben (Fritsch et al., 1998; Hutson et al., 1999). Für die Ausbildung von zwei geschlossenen Ohrvesikeln auf beiden Seiten der Goldbarriere sind zwei Erklärungen denkbar: Da Ohrplakode und Hinterhirn sehr eng benachbart sind, wäre es möglich, daß die Goldbarriere nicht korrekt platziert wurde, so daß ein kleiner Anteil der Ohrplakode nach der Implantation noch medial der Barriere verblieb und beide Plakodenstücke sich dann zu eigenständigen Vesikeln zusammenschlossen. In diesem Fall müßte das Auftreten von zwei Ohrvesikeln als Indiz für eine technisch nicht sauber durchgeführte Implantation gewertet werden. Denkbar wäre es aber auch, daß sich nur das laterale Ohrvesikel aus der ursprünglichen Ohrplakode entwickelte, während das medial geformte Vesikel vom Hinterhirn neu induziert wurde. Die Implantationen wurden an Hühnchenembryonen im 5-12 Somiten-Stadium durchgeführt. Erst kürzlich wurde durch eine detaillierte Transplantationsstudie gezeigt, daß plakodeninduzierende Signale in Hühnchenembryonen mindestens bis zum 10 Somitenstadium vom Hinterhirn ausgehen (Groves et al., 2000). Insofern würde das Zeitfenster der Operationen die Möglichkeit der Neuinduktion des medialen Vesikels durchaus zulassen. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, die Ektodermregion im Bereich der Ohrplakode zu entfernen. Dabei wurde eine stete „Regeneration“ des Ohrektoderms beobachtet (Waddington, 1937; Fritsch et al., 1998), die vermutlich auf einer Neuinduktion durch das benachbarte Hinterhirn beruhte. Geht man von einer Neuinduktion von Innenohrektoderm medial der Barriere aus, so gibt das Fehlen von cNkx5-1-exprimierenden Zellen im medialen Vesikel einen Hinweis darauf, daß das Neuroepithelium des Hinterhirns nicht an der Aktivierung des cNkx5-1-Gens beteiligt ist. Signale zur Genaktivierung könnten ihren Ursprung daher in weiter lateral liegenden Strukturen wie dem Oberflächenektoderm oder lateralen

Bereichen des Mesoderms haben. Eine weitere mögliche Erklärung für das Fehlen von cNkx5-1-Signalen im medialen Vesikel wäre die Annahme, daß es durch das Neuroektoderm medial der Barriere zwar zu einer Neuinduktion von Innenohrektoderm kommt. Infolge des veränderten Zeitfensters ist dieses jedoch nicht mehr kompetent, das gesamte Programm der Ohrentwicklung, sondern nur noch Aspekte davon zu durchlaufen. Als Folge davon fehlen im neuinduzierten Vesikel Komponenten, die sonst zur Aktivierung von cNkx5-1 beitragen. Diese Möglichkeit wird durch Daten aus anderen Laboren unterstützt: So wurde anteriores Epiblastgewebe aus Wachtelebryonen im H.H.-Stadium 3⁺-4, aus dem normalerweise vor allem extraembryonales Ektoderm aber kein Ohrektoderm gebildet wird, in die Ohrregion von Wirtsembryonen im 11-22 Somitenstadium transplantiert. Diese Operation führte in der Mehrzahl der Fälle (90%) zur Induktion eines epithelialen Vesikels aus dem prospektiven Nicht-Ohr-Ektoderm. Die untersuchten Markergene der frühen Ohrentwicklung wurden in den induzierten Vesikeln dagegen in sehr unterschiedlicher Häufigkeit aktiviert: Während BMP7 und Sox-3 in mehr als 80% der induzierten Vesikel nachgewiesen werden konnten, waren nur etwa 20% positiv für Pax2 und Notch. Wurde das Epiblastgewebe dagegen in die prospektive Ohrregion jüngerer Wirtsembryonen im 3-10 Somitenstadium transferiert, so wurden alle untersuchten Markergene in einer Häufigkeit von über 80% aktiviert (Groves et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Fähigkeit des Hinterhirns, Ohrplakoden zu induzieren, zwischen dem 3- und 22-Somitenstadium sukzessive eingeschränkt wird.

4.4.1 BMP2 und Noggin üben entgegengesetzte Effekte auf Morphogenese und frühe Musterbildungsprozesse im Innenohr aus.

In vielen embryonalen Geweben, wie etwa dem Neuralrohr, den Extremitätenknospen und in den Somiten, ist schon seit längerem bekannt, daß Signalmoleküle der BMP-Familie und einer ihrer Antagonisten, das sekretierte Glykoprotein Noggin, in komplementären Mustern exprimiert werden. Durch ihr Zusammenwirken wird die Entwicklung dieser Strukturen maßgeblich gesteuert (McMahon et al., 1998; Capdevila et al., 1998). Erst kürzlich konnte dagegen für das Hühnchen gezeigt werden, daß Noggin und BMP4 auch in einer bestimmten Phase der Innenohrentwicklung ein komplementäres Expressionsmuster besitzen (Chang et al., 1999; Gerlach et al., 2000). Dabei wird Noggin im Ohrgruben- und frühen Ohrvesikelstadium (H.H.-Stadien 12-15) zunächst auf hohem Niveau im gesamten periotischen Mesenchym (POM) exprimiert. Später wird die Noggin-Domäne auf einen anterioren und einen posterioren Bereich des POM konzentriert. Dieser Prozeß geht der Ausbildung BMP4-positiver Foci an den entsprechenden Polen des Ohrvesikels knapp voraus (Gerlach et al., 2000). Die Autoren vermuten, daß die Regionalisierung der BMP4-Transkripte im Vesikel eine Folge der Begrenzung der Noggin-Domäne im POM sein könnte.

Diese von den Aktivitätsmustern der Gene abgeleitete Vorstellung ist jedoch nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit kompatibel: Das BMP4-Muster mit zwei gegenüberliegenden Foci wurde nämlich auch dann aufrecht erhalten, wenn das Ohrepithelium in ein anderes mesenchymales Umfeld transferiert wurde. Zur Unterstützung der oben genannten Hypothese müßte man demzufolge Wechselwirkungen in beide Richtungen, vom Innenohrepithelium zum Mesenchym und umgekehrt, fordern. Diese könnten bewirken, daß das ektopische Mesenchym zunächst POM-Identität erhielte und dann seinerseits Musterbildungsprozesse im Epithelium regulieren könnte. Diese These könnte experimentell zum Beispiel durch Analyse des Noggin-Expressionsverlaufs in Reaktion auf die Transplantation des Plakodenektoderms untersucht werden.

Die eng begrenzte Expression des BMP4-Gens im Ohrvesikel läßt eine Funktion dieses Moleküls in der Innenohrentwicklung vermuten. Da der „knock-out“ des BMP4-Gens in der Maus früh letal ist (Hogan et al., 1994), kann die Funktion von BMP4 in der Innenohrentwicklung nicht klassisch, durch konstitutive Inaktivierung, untersucht werden. Ein alternativer experimenteller Ansatz ist die lokale Überexpression von BMPs oder ihre Ausschaltung durch lokale Applikation des BMP-Antagonisten Noggin.

Durch Implantation von Zellaggregaten, die BMP2 bzw. den BMP-Antagonisten Noggin exprimierten, anterior oder posterior der Ohrplakode im Hühnchen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß beide Moleküle entgegengesetzte Effekte auf die Innenohrentwicklung haben. Während die ektopische Gabe von BMP2 zur transienten Ausbildung ektopischer epithelialer Strukturen führte, wurde die Innenohrmorphogenese nach Behandlung mit Noggin im späten Ohrvesikelstadium arretiert. Diesen morphogenetischen Effekten gingen entgegengesetzte Veränderungen in den Aktivitätsmustern verschiedener innenohrspezifischer Transkriptionsfaktoren voraus. Während die Expression der Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren *cNkx5-1* und *Dlx5* durch ektopisches BMP2 deutlich verstärkt wurde, konnte *Dlx5* durch ektopisches Noggin drastisch reduziert und *cNkx5-1* sogar ausgelöscht werden. Die Aktivität des eng mit *cNkx5-1* verwandten Homöoboxgens *SOHo* wurde durch Noggin-Gabe ebenfalls stark reduziert, von ektopischem BMP2 jedoch nur wenig beeinflusst. Dahingegen wurde die innenohrspezifische Expression von *Pax2* weder von BMP2 noch von Noggin beeinflusst. Aufgrund ihrer Expressionsmuster und der entsprechenden „knock-out“-Phänotypen kann man sowohl *Nkx5-1* als auch *Dlx5* als Kontrollgene für die Morphogenese der Bogengänge ansehen (Hadrys et al., 1998, Wang et al., 1998, Acampora et al., 1999; Depew et al., 1999), während *Pax2* die Entwicklung der Cochlea steuert (Torres et al., 1996). Daher liegt es nahe, dem Zusammenspiel von BMP mit seinem Antagonisten Noggin eine wichtige Rolle für die Morphogenese vestibulärer, aber nicht auditiver Strukturen zuzusprechen. Eine solche Funktion von BMP4 würde mit seiner späten Expression in Teilen des Bogengangepitheliums korrelieren (Wu et al., 1996). Eine Induzierbarkeit des *Dlx5*-Gens durch BMP4 wurde bereits im Zusammenhang mit der Differenzierung von

Osteoblasten und in der Mesoderminduktion nachgewiesen (Miyama et al., 1999). Inwieweit die Expression des Nkx5-1-Gens von Mitgliedern der BMP-Familie abhängig ist, wurde bisher in keinem anderen Kontext untersucht. Die Aktivität von Nkx5-1 ist in Dlx5-„knock-out“ Mäusen unverändert, und umgekehrt wird auch Dlx5 in Nkx5-1 „knock-out“ Mäusen normal exprimiert (Acampora et al., 1999). Das zeigt, daß beide Gene einander nicht regulieren und damit zwei unterschiedlichen an der Morphogenese der Bogengänge beteiligten Signalwegen angehören. Die Induzierbarkeit von cNkx5-1 und Pax2 durch BMP2 weist auf eine mögliche Funktion von BMPs in beiden Signalwegen hin.

Interessanterweise wurde die Funktion von BMP4 und Noggin zeitgleich mit den hier beschriebenen Implantationsversuchen in zwei weiteren Laboren durch Implantationen bzw. Virusinjektionen an Hühnchenembryonen im Ohrvesikelstadium untersucht. Die Applikation von Noggin resultierte trotz des späteren Zeitfensters der Operationen auch hier in massiven Störungen in der Entwicklung vestibulärer Innenohrstrukturen, insbesondere der Bogengänge (Chang et al., 1999; Gerlach et al., 2000). Verschiedene experimentelle Techniken führten dabei zum gleichen Phänotyp: Die Injektion von replikationskompetenten, Noggin kodierenden Retroviren in das Lumen von Ohrvesikeln, die mesenchymale Implantation mit rekombinantem Noggin getränkter Perlen an E 3,5 - 4,0 (Chang et al., 1999) und Implantationen mit Noggin produzierenden CHO-Zellen bewachsener Perlen an E2,5 - E4,0 ins periotische Mesenchym (Gerlach et al., 2000). Für die Ausprägung des Phänotyps war es dabei unerheblich, ob der Wirtsembryo der ektopischen Noggin-Quelle für die gesamte Inkubationsdauer ausgesetzt war oder diese sieben bis zwölf Stunden nach der Operation wieder entfernt wurde. Die Differenzierung der Haarzellen in den sensorischen Epithelien wurde durch ektopische Noggin-Gabe nicht beeinflusst (Gerlach et al., 2000). Das steht mit der bereits diskutierten Vorstellung im Einklang, daß prospektive Sinnesepithelien im Ohrvesikelstadium bereits determiniert sind und ihre Differenzierung unabhängig von äußeren Einflüssen ablaufen kann (Wu et al., 1998). Die lokale Überexpression von BMP4 im Ohrgruben- oder Ohrvesikelstadium hatte im Gegensatz zu den von mir durchgeführten Experimenten keinen Einfluß auf die Innenohrmorphogenese (Gerlach et al., 2000). Vermutlich ist das unterschiedliche Alter der operierten Embryonen die Hauptursache für die beobachteten Abweichungen der BMP-vermittelten Effekte. Ohrektoderm scheint im Plakodenstadium noch kompetent zur Interpretation von BMP-Signalen zu sein, diese Kompetenz jedoch im Vesikelstadium verloren zu haben. Qualitative Differenzen in der Wirkungsweise von BMP2 und BMP4 sollten meiner Meinung nach von untergeordneter Bedeutung sein, da für verschiedene Mitglieder der BMP-Familie ähnliche biochemische Eigenschaften nachgewiesen wurden (Übersichtsartikel von Hogan, 1996). Auch die Noggin-vermittelten Störungen der Ohrentwicklung waren stark vom Alter der Wirtsembryonen abhängig: Im Ohrplakodenstadium wurde, wie in dieser Arbeit gezeigt, die Differenzierung des Ohrvesikels vollständig blockiert. In

späteren Stadien wurde die Morphogenese vestibulärer Strukturen deutlich stärker beeinflusst als die der Cochlea (Gerlach et al., 2000; Chang et al., 1999).

4.4.2 BMP- und Noggin-Behandlung resultieren in einer erhöhten Apoptoserate im Innenohrepithelium.

Die Überexpression von BMP bzw. seinem Antagonisten Noggin in Nachbarschaft der Ohrplakode resultierte in entgegengesetzten Effekten: Während eine BMP-Behandlung die Ausbildung zusätzlicher epithelialer Strukturen stimulierte, wurde die Innenohrmorphogenese nach Noggin-Behandlung im Ohrvesikelstadium blockiert. Überraschenderweise führten beide Faktoren trotz ihrer antagonistischen Wirkungsweise und der beobachteten entgegengesetzten morphogenetischen Effekte zu einer Steigerung der Apoptoserate im Innenohrepithelium selbst und anderen, dem Implantat benachbarten ektodermalen Geweben. Eine solche, erhöhte Apoptose wurde auf der nicht-operierten Seite oder in Embryonen, die Kontrollimplantate empfangen hatten, nie beobachtet. Daß ein erhöhtes Vorkommen apoptotischer Zellen nach BMP-Implantation mit der Ausbildung zusätzlicher epithelialer Strukturen einhergeht, erscheint zunächst widersprüchlich. Eine Rolle von BMPs bei der Ausstülpung epithelialer Gänge wurde jedoch auch in anderen Prozessen nachgewiesen, wie etwa der Verzweigung des Lungenepithels (Bellusci et al., 1996), der Ausbildung der Nierenkanälchen (Hogan, 1996), bei der Entwicklung der Finger und Zehen (Merino et al., 1998; Zhou et al., 1996) und der Neuralleistenzellen im Bereich des Hinterhirns (Graham et al., 1994). In allen diesen Prozessen führte eine lokale BMP4-Überexpression zu einer erhöhten Zelltodrate, während die Einführung von Noggin programmierten Zelltod verhinderte. In der hier durchgeführten Implantationsstudie resultierte die ektopische Gabe von Noggin jedoch ebenfalls in einer Verstärkung der Apoptoserate. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen sekundären Effekt: Durch die Noggin-Behandlung wurde die Morphogenese des Innenohrs arretiert, was den Abbau von Zellen durch Apoptose zur Folge hatte. Ein direkter oder BMP-vermittelter Einfluß von Noggin auf den Apoptoseprozeß erscheint dagegen eher unwahrscheinlich. Ein vermehrtes Vorkommen apoptotischer Zellen im Innenohrepithelium infolge ektopischer Noggin-Gabe wurde interessanterweise auch in einer weiteren Studie beobachtet. Hier resultierte die Implantation von mit rekombinantem *Xenopus* Noggin-Protein getränkten Perlen innerhalb von sechs Stunden nach der Operation in einer deutlichen Abnahme der Zellproliferation. Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen konnte dagegen erst 36 Stunden nach der Manipulation nachgewiesen werden (Chang et al., 1999). Abnahme der Zellproliferation und Steigerung der Apoptose korrelierten auch hier mit einer deutlichen Verkleinerung der Bogengangprimordien und scheinen daher auch einen sekundären Effekt darzustellen.

4.4.3 BMPs und FGFs beeinflussen unterschiedliche Aspekte der frühen Innenohrmorphogenese.

Neben den BMPs bilden die FGFs eine komplexe Familie von Wachstumsfaktoren mit entscheidendem Einfluß auf eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen in Vertebraten und Invertebraten. Bis heute wurden 19 FGFs (FGF1-19) identifiziert, die ihre biologische Wirkung durch Aktivierung von vier Rezeptoren (FGFR1-4) entfalten (Hebert et al., 1990; Ornitz et al., 1996). Mindestens fünf Mitglieder der FGF-Familie, FGF2, FGF3, FGF5, FGF8 und FGF10, sowie verschiedene Isoformen der Rezeptoren FGFR2 und FGFR3 werden entweder im Innenohr selbst oder in benachbarten Geweben exprimiert und beeinflussen Innenohrmorphogenese und Zelldifferenzierung in allen Entwicklungsphasen (Represa et al., 1991; Fekete, 2000).

Besonders FGF3 wird eine wichtige Rolle für die Induktion der Innenohrplakode und die Steuerung der Innenohrmorphogenese zugeschrieben (Represa et al., 1991; Mansour et al., 1993; Lombardo et al., 1998a und 1998b; Pirvola et al., 2000; Vendrell et al., 2000). So konnte in Hühnchenembryonen gezeigt werden, daß die Behandlung mit FGF3-Gegensinn-Oligonukleotiden die Ausbildung der Ohrplakode verhindert (Represa et al., 1991), während die virale Überexpression ektopische Ohrvesikel induziert (Vendrell et al., 2000). Dahingegen zeigen sowohl FGF3-defiziente Mäuse als auch Mäuse mit einer Mutation in einem der FGF-Rezeptoren, FGFR-2(IIIb), an den FGF3 und das ebenfalls im Ohr exprimierte FGF10 mit hoher Affinität binden, erst Defekte in der späteren Differenzierung des Ohrvesikels, die zu stark mißgebildeten Innenohren führen (Mansour et al., 1993; Pirvola et al., 2000).

Während in Hühnchenembryonen nur FGF3, nicht aber FGF2, ein ohrinduzierendes Potential besitzt (Vendrell et al., 2000), scheinen in *Xenopus*-Embryonen beide Moleküle in der Lage zu sein ektopische Plakoden zu induzieren (Lombardo et al., 1998a und 1998b). Die beobachteten Differenzen im induktiven Potential beider Moleküle wurden auf Spezies-bedingte Unterschiede in der Ohrentwicklung zurückgeführt (Vendrell et al., 2000; Fekete, 2000). Parallel mit den in dieser Arbeit vorgestellten BMP-Implantationen wurden in unserem Labor in Zusammenarbeit mit Maja Adamska auch Implantationen von mit rekombinantem basischem FGF (FGF2) oder FGF8 getränkten Heparinperlen, durchgeführt. Diese Experimente zeigten, daß eine lokale Überdosierung beider FGF-Moleküle zu vergrößerten Ohrvesikeln und Veränderungen in der Aktivität einiger der untersuchten Markergene führte. Die Behandlung mit FGF2 resultierte zudem in einigen Fällen in der Ausbildung ektopischer Ohrvesikeln in Nachbarschaft des endogenen Vesikels (Adamska et al., eingereicht zur Publikation). In der Literatur werden für eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen entgegengesetzte Wirkungsweisen von BMPs und FGFs beschrieben: BMPs propagieren dabei im allgemeinen Zelldifferenzierung und programmierten Zelltod, während FGFs Wachstum und Zellteilung fördern und dazu beitragen, Gewebe in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Nur ein fein abgestimmtes Zusammenspiel beider Molekülgruppen resultiert in einem normalen Ablauf

der Morphogenese. Beispiele hierfür liefern so unterschiedliche Prozesse wie die Entwicklung der Gliedmaßen (Niswander et al., 1993; Merino et al., 1998), der Zähne (Neubüser et al., 1997) oder die Ausbildung der Lungenknospen (Weaver et al., 2000). Obgleich BMPs und FGFs entgegengesetzte Effekte vermitteln, wurde für verschiedene Prozesse gezeigt, daß sie dabei teilweise die gleichen Zielgene aktivieren. So wird beispielsweise im Rahmen der Erythropoese im Krallenfrosch *Xenopus* das PV.1-Gen durch BMP4 und FGF aktiviert, der Transkriptionsfaktor GATA-2 dagegen nur durch BMP4 (Xu et al., 1999). In der Neurulation des Hühnchens wurde die Aktivierung von *Msx-1* durch FGF8 und BMP4 und ein Zusammenwirken beider Faktoren in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Grenzen der Neuralplatte beschrieben (Streit et al., 1999). Andere embryonale Prozesse, wie die Entwicklung des Nierenmesenchyms (Dudley et al., 1999) erfordern hingegen die synergistische Aktion von FGFs und BMPs. Auch die Induktion kontraktile Vesikel aus nicht-kardialen Mesoderm erfordert die gleichzeitige Gabe von FGF2 und BMP4, während keines der beiden Moleküle allein einen solchen Effekt vermitteln kann (Lough et al., 1996).

Die Rolle von BMPs und FGFs in der Entwicklung des Innenohrs, wie sie aus den in unserem Labor durchgeführten Implantationsstudien und weiteren in der Literatur beschriebenen Experimenten abgeleitet werden kann, läßt sich mit dem oben geschilderten Bild der Wirkungsweisen beider Moleküle gut in Einklang bringen. Die verschiedenen Experimente zeigen, daß sowohl FGFs als auch BMPs wesentlichen Einfluß auf die frühe Innenohrentwicklung nehmen. Bei genauerer Betrachtung können jedoch deutliche Unterschiede in den von beiden Genen vermittelten Effekten festgestellt werden: Während BMPs keinen offensichtlichen trophischen Einfluß auf das Ohreithelium auszuüben schienen, sondern vor allem die Morphogenese der Innenohrkompimente beeinflussen (diese Arbeit sowie Chang et al., 1999; Gerlach et al., 2000), zeigten FGFs einen wachstumsstimulierenden Effekt. Zudem wurde gezeigt, daß FGF2 und FGF3 Oberflächenektoderm in Ohrektoderm transformieren und somit die Ausbildung ektopischer Epithelien mit Ohridentität induzieren können (Adamska et al., eingereicht zur Publikation und Vendrell et al., 2000). BMPs scheinen dagegen nicht in der Lage zu sein, Epithelium mit Innenohrcharakter *de novo* zu induzieren. Nach BMP-Behandlung im Ohrplakodenstadium konnte lediglich eine transiente Ausbildung zusätzlicher epithelialer Strukturen innerhalb des Ohrvesikels, nicht jedoch die Induktion ektopischer Plakoden beobachtet werden. Auch die Expression der untersuchten innenohrspezifischen Gene wurde von FGF2 und BMP2 in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Lediglich die Aktivität des Homöoboxgens *cNkx5-1* wurde von beiden Molekülen, FGF und BMP, gleichermaßen verstärkt. Die Aktivität des ebenfalls an der Kontrolle der Bogengangmorphogenese beteiligten *Dlx5*-Gens wurde hingegen durch BMP-Gabe verstärkt (bzw. durch *Noggin* ausgelöscht), während eine FGF-Behandlung keinen Einfluß auf *Dlx5* hatte. Unterschiede in der Reaktion von *cNkx5-1* und *Dlx5*, wie sie nach FGF-Applikation beobachtet wurden, lassen sich dabei eher mit der von der „knock-out“-Situation (siehe oben) abgeleiteten Idee

vereinbaren, daß Nkx5-1 und Dlx5 parallelen Signalübertragungswegen angehören, die weitgehend unabhängig voneinander arbeiten. Dahingegen wurde die Expression von Pax2, auf die eine BMP- oder Noggin-Behandlung keinen Einfluß hatte, infolge der ektopischen FGF-Quelle deutlich verstärkt. Eine gleichgerichtete Wirkung von FGF auf cNkx5-1 und Pax2 läßt sich wiederum nur schwer mit der Vorstellung vereinbaren, daß beide Gene in der Kontrolle vestibulärer bzw. auditiver Ohrstrukturen unabhängig voneinander reguliert werden.

Das differenzierte Verhalten der untersuchten ohrspezifischen Markergene in Reaktion auf die Transplantation von Ohrektoderm in ein verändertes räumliches Umfeld oder die Konfrontation mit zusätzlichen Quellen verschiedener Signalmoleküle erlaubt es nicht, ein einfaches Modell aufzustellen, nach dem Markergene eindeutig einem einzigen Signalübertragungsweg zuzuordnen sind, der dann allein und unabhängig die Morphogenese bestimmter Strukturen oder die Differenzierung einzelner Zelltypen steuert. Hinzu kommt, daß neben den in unserem Labor betrachteten Signalmolekülen der BMP- und FGF-Familien eine Vielzahl weiterer sekretierter Moleküle, wie beispielsweise Mitglieder der NGF- (Nerve Growth Factor), IGF- (Insuline-like Growth Factor), Wnt- und Eph-Genfamilien und deren Rezeptoren sowie eine Vielzahl hier nicht vorgestellter Transkriptionsfaktoren aus unterschiedlichen Genfamilien in einem dynamischen räumlich-zeitlichen Muster im sich entwickelnden Innenohr aktiv sind und ihre Ausschaltung teilweise zu schweren Störungen der Innenohrentwicklung führt (Übersichtsartikel von Fritsch et al., 1998 und Torres et al., 1998). Daher muß man vielmehr vermuten, daß Knotenpunkte existieren, an denen die verschiedenen Signalwege miteinander zu einem komplexen Netzwerk verschaltet sind, und sich so Veränderungen in einem Signalweg auf Effektoren mehrerer Wege auswirken können. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien tragen zum Verständnis eines solchen molekularen Netzwerks bei.

5. Literatur

Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y., Brulet, P., Simeone, A. (1996) Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the *Otx1* gene. *Nat. Genet.* **14**, 218-222

Acampora, D., Merlo, G. R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M. P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A., Levi, G. (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* **126**, 3795-3809

Adam, J., Myat, A., Le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Lewis, J. (1998) Cell fate choices and the expression of Notch, Delta and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* **126**, 4645-4654

Adamska, M., Leger, S., Brand, M., Hadrys, T., Braun, T., Bober, E. (2000) Inner ear and lateral line expression of a zebrafish *Nkx5-1* gene and its downregulation in the ears of FGF8 mutant ace. *Mech. Dev.* **97**, 161-165

Adamska, M. (2001) *Nkx5* genes in inner ear development and genome evolution. Der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Universität der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg eingereichte Doktorarbeit

Adamska, M., Herbrand, H., Adamski, M., Krüger, M., Braun, T., Bober, E. FGFs control the growth and patterning of the otocyst, but are not able to induce full ear program. Eingereicht zur Publikation.

Andrée, B., Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H. H., Brand, T. (1998) BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in the chick embryo. *Mech. Dev.* **70**, 119-131

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. T., Seidmann, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1992) *Current protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A., Zoghbi, H. Y. (1999) *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* **284**, 1837-1841

- Bissonnette, J. P., Fekete, D. M.** (1996) Standard Atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J. Comp. Neurol.* **368**, 620-630
- Brigande, J. V., Kiernan, A. E., Gao, X., Iten, L. E., Fekete, D. M.** (2000a) Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: Do compartment boundaries play a role ? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (22), 11700-11706
- Brigande, J. V., Iten, L. E., Fekete, D. M.** (2000b) A fate map of chick otic cup closure reveals lineage boundaries in the dorsal otocyst. *Dev. Biol.* **227**, 256-270
- Bober, E., Baum, C., Braun, T., Arnold, H. H.** (1994) A novel NK-related mouse homeobox gene: expression in central and peripheral nervous structures during embryonic development. *Dev. Biol.* **162**, 288-303
- Cantos, R., Cole, L. K., Acampora, D., Simeone, A., Wu, D. K.** (2000) Patterning of the mammalian cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 11707-11713
- Capdevila, J., Johnson, R. L.** (1998) Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev. Biol.* **197**, 205-217
- Chang, W., Nunes, F. D., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R., Wu, D. K.** (1999) Ectopic noggin blocks sensory and nonsensory organ morphogenesis in the chicken inner ear. *Dev. Biol.* **216**, 369-381
- Cordes, S. P., Barsh, G. S.** (1994) The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* **79**, 1025-1034
- Davis, J. M.** (1994) *Basic Cell Culture: A Laboratory Approach*. London: Oxford University Press
- Deitcher, D. L., Fekete, D. M., Cepko, C. L.** (1994) Asymmetric expression of a novel homeobox gene in vertebrate sensory organs. *J. Neurosci.* **14**, 486-498
- Deol, M. S.** (1964) The abnormalities in the inner ear in *kreisler* mice. *J. Embryol. Exper. Morphol.* **12**, 475-490

- Deol, M. S.** (1966) Influence of the neural tube on the differentiation of the inner ear in the mammalian embryo. *Nature* **209**, 219-220
- Depew, M. J., Liu, J. K., Presley, R., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L. R.** (1999) Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* **126**, 3831-3846
- Dickson, C., Peters, G.** (1987) Potential oncogene product related to growth factors. *Nature* **326**, 833
- Dudley, A. T., Godin, R. E., Robertson, E. J.** (1999) Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev.* **13**, 1601-1613
- Duprez, D., Kostakopoulou, P. H., Francis-West, P. H., Tickle, C., Brickell, P. M.** (1996) Activation of FGF-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the chick limb. *Development* **122**, 1821-1828
- Eddison, M., Le Roux, I., Lewis, J.** (2000) Notch signaling in the development of the vertebrate ear: Lessons from *Drosophila*.. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (22), 11692-11699
- Ekker, M., Akimenko, M. A., Bremiller, R., Westerfield, M.** (1992) Regional expression of three homeobox transcripts in the inner ear of zebrafish embryos. *Neuron* **9**, 27-35
- Epstein, D. J., Vekemans, M., Gruss, P.** (1991) *spotch* (*Sp2H*), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* **67**, 767-774
- Erkman, L., McEvelly, R. J., Lou, L., Ryan, A. K., Hooshmand, F., O'Connell, S. M., Keithley, E. M., Rapaport, D. H., Ryan, A. F., Rosenfeld, M. G.** (1996) Role of transcription factors BRN3.1 and BRN3.2 in auditory and visual development. *Nature* **381**, 603-606
- Fekete, D. M., Muthukumar, S., Karagoeos, D.** (1998) Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J. Neurosci.* **18**, 7811-7821
- Fekete, D. M.** (1996) Cell fate specification in the inner ear. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 533-541

Fekete, D. M. (1999) Development of the vertebrate ear: insights from knockouts and mutants. *Trends Neurosci.* **22** (6), 263-269.

Fekete, D. M. (2000) Ear rings: FGF3 involvement comes full circle. *Trends Neurosci.* **23**, 332

Ferrari, D., Sumoy, L., Gannon, J., Sun, H., Brown, A. M., Upholt, W. B., Kosher, R. A. (1995) The expression pattern of the Distal-less homeobox-containing gene *Dlx-5* in the developing chick limb bud suggests its involvement in apical ectodermal ridge activity, pattern formation and cartilage differentiation. *Mech. Dev.* **52**, 257-264

Fritsch, B., Barald, K. F., Lomax, M. I. (1998) Early embryology of the vertebrate ear. In *Development of the Auditory System* (Editoren E. W. Rubel, A. N. Popper und R. R. Fay) S. 80-145. Springer Verlag, New York.

Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S. P., Halamek, L. P., Barsh, G. S. (1993) Altered rhombomere specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, *kreisler (kr)*. *Development* **117**, 925-936

Gallagher, B. C., Jonathan J. H., Grainger, R. M. (1996) Inductive processes leading to inner ear formation during *Xenopus* development. *Dev. Biol.* **175**, 95-107

Gerlach, L. M., Hutson, M. R., Germiller, J. A., Nguyen-Luu, D., Victor, J. C., Barald, K. F. (2000) Addition of the BMP4 antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development. *Development* **127**, 45-54

Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J., Gruss, P. (1991) Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* **10**, 1135-1147

Groves, A. K., Bronner-Fraser, M. (2000) Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* **127**, 3489-3499

Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H., Bober, E. (1998) Nkx5-1 controls semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* **125**, 33-39

Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49-91

Harrison, R. G. (1945) Relations of symmetry in the developing embryo. *Trans. Conn. Acad. Arts Sci.* **36**, 277-330

Hebert, J. M., Basilico, C., Goldfarb, M., Haub, O., Martin, G. R. (1990) Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression patterns during embryogenesis. *Dev. Biol.* **138**, 454-463

Herbrand, H., Guthrie, S., Hadrys, T., Hoffmann, S., Arnold, H. H., Rinkwitz-Brandt, S., Bober, E. (1998) Two regulatory genes, cNkx5-1 and cPax2, show different responses to local signals during otic placode and vesicle formation in the chick embryo. *Development* **125**, 645-654

Hertwig, P. (1944) Die Genese der Gehirn- und Hörorganmißbildungen bei röntgenmutagenisierten *Kreisler*-Mäusen. *Z. Konst. Lehre* **28**, 327-354

Hidalgo-Sánchez, M., Alvarado-Mallart, R.-M., Alvarez, I. S. (2000) Pax2, Otx2, Gbx2 and Fgf8 expression in early otic vesicle development. *Mech. Dev.* **95**, 225-229

Hogan, B. L. (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 432-438

Hutson, M. R., Lewis, J. E., Nguyen-Luu, D., Lindberg, K. H., Barald, K. F. (1999) Expression of Pax2 and patterning of the chick inner ear. *J. Neurocyt.* **28**, 795-807

Jacobsen, A. G. (1963) The determination and positioning of the nose, lens and ear. *J. Exp. Zool.* **154**, 273-303

Jacobsen, A. G. (1966) Inductive processes in embryonic development. *Science* **152**, 25-34

Kiernan, A. E., Nunes, F., Wu, D. K., Fekete, D. M. (1997) The expression domain of two related homeobox genes defines a compartment in the chicken inner ear that may be involved in semicircular canal formation. *Dev. Biol.* **191**, 215-229

Kim, Y., Nirenberg, M. (1989) *Drosophila* NK-homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7716-7720

- Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., Harland, R. M.** (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-718
- Lanford, P. J., Jiang, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T., Kelley, M.** (1999) Notch signaling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat. Genet.* **21**, 289-292
- Lang, H., Miller Bever, M., Fekete, D. M.** (2000) Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear: Spatial and temporal patterns. *J. Comp. Neurol.* **417**, 205-220
- Li, C. W., Van De Water, T. R., Ruben, R. J.** (1978) The fate mapping of the eleventh and twelfth day mouse otocyst: an in vitro study of the sites of origin of the embryonic inner ear sensory structures. *J. Morph.* **157**, 249-268
- Lombardo, A., Slack, J. M. W.** (1998a) Postgastrulation effects of fibroblast growth factor on *Xenopus* development. *Dev. Dyn.* **212**, 75-85
- Lombardo, A., Isaacs, H. V., Slack, J. M. W.** (1998b) Expression and functions of FGF-3 in *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 1101-1107
- Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D. L., Zhu, X.** (1996) Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non cardiac mesoderm. *Dev. Biol.* **178**, 198-202
- Ma, Q., Chen, Z., Barrantes, I., de la Pompa, J. L., Anderson, D. J.** (1998) neurogenin 1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* **20**, 469-482
- Mahamood, R., Kiefer, P., Gunthrie, S., Dickson, C., Mason, I.** (1995) Multiple roles for fgf-3 during cranial neural development in the chicken. *Development* **121**, 1399-1410
- Malicki, J., Schier, A. F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D., Neuhauss, S. C. F., Stainier, D. Y. R., Abdelilah, S., Rangini, Z., Zwartkruis, F., Driever, W.** (1996) Mutations affecting development of the zebrafish ear. *Development* **123**, 275-283

- Mansour, S. L., Goddard, J. M., Cappechi, M. R.** (1993) Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene *int-2* have developmental defects in the tail and inner ear. *Development* **117**, 13-28
- Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J. L., Ruberte, E., Olivo, J. C., Dollé, P., Gorry, P., Lumsden, A., Chambon, P.** (1993) Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development* **119**, 319-338
- Martinez, P., Davidson, E. H.** (1997) *SpHmx*, a sea urchin homeobox gene expressed in embryonic pigment cells. *Dev. Biol.* **181**, 213-222
- McKay, I. J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A., Lewis, J.** (1994) The *kreisler* mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* **119**, 319-338
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M., McMahon, A. P.** (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* **12**, 1438-1452
- Mendonsa, E. S., Riley, B. B.** (1999) Genetic analysis of tissue interactions required for otic placode induction in the zebrafish. *Dev. Biol.* **206**, 100-112
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T., Hurle, J. M.** (1998) Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas and noggin through BMP signaling. *Dev. Biol.* **200**, 35-45
- Miyama, K., Yamada, G., Yamamoto, T. S., Tagaki, C., Miyado, K., Sakai, M., Ueno, N., Shibuya, H.** (1999) A BMP-inducible gene, *Dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev. Biol.* **208**, 123-133
- Neubüser, A., Peters, H., Balling, R., Martin, G. R.** (1997) Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth. *Cell* **90**, 247-255
- Niswander, L., Martin, G. R.** (1993) FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* **361**, 68-71

- Noden, D. M., Van De Water, T. R.** (1986) The developing ear: tissue origins and interactions. In: Ruben et al (Eds.), *The Biology of Change in Otolaryngology*. Elsevier, Amsterdam, S. 15-46
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U., Gruss, P.** (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax-2 during murine neurogenesis. *Development* **109**, 797-809
- Pera, E., Stein, S., Kessel, M.** (1999) Ectodermal patterning in the avian embryo: epidermis versus neural plate. *Development* **126**, 63-73
- Peters, G., Brookes, S., Smith, R., Dickson, J. C.** (1983) Tumorigenesis by mouse mammary tumour virus: evidence for a common provirus integration in mammary tumours. *Cell* **33**, 369-377
- Phippard, D., Lu, L., Lee, D., Saunders, J. C., Crenshaw, E. B., 3rd** (1999) Targeted mutagenesis of the POU-domain gene Brn4/Pou3f4 causes developmental defects in the inner ear. *J. Neurosci.* **19**, 5980-5989
- Pirvola, U., Spencer-Dene, B., Xing-Qun, L., Kettunen, P., Thesleff, I., Fritzsche, B., Dickson, C., Ylikowski, J.** (2000) FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J. Neurosci.* **20** (16) 6125-6134
- Qiu, M., Bulfone, A., Ghattas, I., Meneses, J. J., Christensen, L., Sharpe, P. T., Presley, R., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L. R.** (1997) Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1 and Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev. Biol.* **185**, 165-184
- Represa, J., León, Y., Miner, C., Giraldez, F.** (1991) The proto-oncogene int-2 is responsible for induction of the inner ear. *Nature* **353**, 561-563
- Rinkwitz-Brandt, S., Justus, M., Oldenettel, I., Arnold, H. H., Bober, E.** (1995) Distinct temporal expression of mouse Nkx-5.1 and Nkx-5.2 homeobox genes during brain and ear development. *Mech. Dev.* **52**, 371-381
- Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H., Bober, E.** (1996) Regional expression of Nkx-5.1, Nkx-5.2, Pax-2 and sek genes during inner ear development. *Hearing Research* **99**, 129-138

- Romanoff, A.L.** (1960) The organ of special sense. In: The avian embryo structure and function. New York: MacMillan, S. 365-381
- Russell, W. L.** (1947) Splotch, a new mutation in the house mouse *Mus musculus*. Genetics **32**, 107
- Salminen, M., Meyer, B. I., Bober, E., Gruss, P.** (2000) netrin1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. Development **127**, 13-20
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1987) Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Second Edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schultheiss, T. M., Burch, J. B., Lassar, A. B.** (1997) A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. Genes Dev. **11**, 451-462
- Shailam, R., Lanford, P. J., Dolinsky, C. M., Norton, C. R., Gridley, T., Kelley, M.** (1999) Expression of proneural and neurogenic genes in the embryonic mammalian vestibular system. J. Neurocytol. **28**, 809-819
- Simeone, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Gulisano, M., Mallamaci, A., Kastury, K., Druck, T., Huebner K.** (1994) Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**, 2250-2254
- Spector, D. L., Goldman, R. D., Leinwand, L. A.** (1998) Cells: A Laboratory Manual, Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stadler, H. S., Padanilam, B. J., Buetow, K., Murray, J. C., Solursh, M.** (1992) Identification and genetic mapping of a homeobox gene to the 4p16.1 region of the human chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci. **89**, 11579-11583
- Stadler, H. S., Solursh, M.** (1994) Characterization of the homeobox-containing gene GH6 identifies novel regions of homeobox gene expression in the developing chick embryo. Dev. Biol. **161**, 251-262
- Stadler, H. S., Murray, J. C., Leysens, N. J., Goodfellow, P. J., Solursh, M.** (1995) Phylogenetic conservation and physical mapping of members of the H6 homeobox gene family. Mammalian Genome **6**, 383-388

- Stark, M. R., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., Marcelle, C.** (1997) Neural tube-ectoderm interactions are required for trigeminal placode formation. *Development* **124**, 4287-4295
- Streit, A., Stern, C. D.** (1999) Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech. Dev.* **82**, 51-66
- Tannahill, D., Isaacs, H. V., Close, M. J., Peters, G., Slack, J. M. W.** (1992) Developmental expression of the *Xenopus* int-2 (fgf-3) gene: activation by mesodermal and neural induction. *Development* **115**, 695-702
- ten Berge, D., Brouwer, A., Korving, J., Martin, J. F., Meijlink, F.** (1998) Prx1 and Prx2 in skeletogenesis: roles in the craniofacial region, inner ear and limbs. *Development* **125**, 3831-3842
- Torres, M., Gómez-Pardo, E., Gruss, P.** (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* **121**, 4057-4065
- Torres, M., Giraldez, F.** (1998) The development of the vertebrate inner ear. *Mech. Dev.* **71**, 5-21
- Urist, M. R., Mikulski, A., Lietze, A.** (1979) Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 1828-1832
- Van Bartheld, C. S., Patterson, S. L., Heuer, J. G., Wheeler, E. F., Bothwell, M., Rubel, E.W.** (1991) Expression of nerve growth factor (NGF) receptor in the developing inner ear of chick and rat. *Development* **113**, 455-470
- Van De Water, T. R., Conley, X.** (1982) Neural inductive message to the mammalian inner ear: contact mediated versus extracellular matrix interaction. *Anat. Rec.*, 195A
- Van De Water, T. R., Represa, J.** (1991) Tissue interactions and growth factors that control development of the inner ear. *Ann. NY Acad. Sci.* **630**, 116-128
- Vendrell, V., Carnicero, E., Giraldez, F., Alonso, M. T., Schimmang, T.** (2000) Induction of inner ear fate by FGF3. *Development* **127**, 2011-2019
- Vogel, K. S., Davies, A. M.** (1993) Heterotypic transplantation of presumptive placodal ectoderm changes the fate of sensory neuron precursors. *Development* **119**, 263-276

- Waddington, C. H.** (1937) The determination of the auditory placode in the chick. *J. Exp. Biol.* **14**, 1435-1449
- Wang, W., Van De Water, T., Lufkin, T.** (1998) Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development* **125**, 621-634
- Wang, W., Lo, P., Frasch, M., Lufkin, T.** (2000) Hmx: an evolutionary conserved homeobox gene family expressed in the developing nervous system in mice and drosophila. *Mech. Dev.* **99**, 123-137
- Weaver, M., Dunn, N. R., Hogan, B. L.** (2000) BMP4 and FGF10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development* **127**, 2695-2704
- Whitfield, T. T., Granato, M., van Eeden, F. J. M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., Nüsslein-Vollhard, C.** (1996) Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* **123**, 241-254
- Wilkinson, D. G., Peters, G., Dickson, C., McMahon, A. P.** (1988) Expression of the fgf related proto-oncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO J.* **7**, 691-695
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A.** (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528-1534
- Wu, D. K., Oh, S. H.** (1996) Sensory organ generation in the chick inner ear. *J. Neurosci.* **16**, 6454-6462
- Wu, D. K., Nunes, F. D., Choo, D.** (1998) Axial specification for sensory organs versus non-sensory structures of the chicken inner ear. *Development* **125**, 11-20
- Xiang, M., Gan, L., Li, D., Chen, Z.-Y., Zhou, L., O'Malley, B., Klein, W., Nathans, J.** (1997) Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9445-9450
- Xiang, M., Gao, W.-Q., Hasson, T., Shin, J. J.** (1998) Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development* **125**, 3935-3946

Xu, R. H., Ault, K. T., Kim, J., Park, M., Hwang, Y. S., Peng, Y., Sredni, D., Kung, H. (1999) Opposite effects of FGF and BMP-4 on embryonic blood formation: roles of PV.1 and GATA-2. *Dev. Biol.* **208**, 352-361

Yang, L., Zhang, H., Hu, G., Wang, H., Abate-Shen, C., Shen, M. M. (1998) An early phase of embryonic *Dlx5* expression defines the rostral boundry of the neural plate. *J. Neurosci.* **18**, 8322-8330

Yntema, C. L. (1933) Experiments on the determination of the ear ectoderm in the embryo of *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* **65**, 317-357

Yntema, C. L. (1939) Self-differentiation of heterotopic ear ectoderm in the embryo of *Amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* **80**, 1-17

Yntema, C. L. (1950) An analysis of induction of the ear from foreign ectoderm in the salamander embryo. *J. Exp. Zool.* **113**, 211-244

Yntema, C. L. (1955) Ear and nose. In Willier, B. H., Weiss, P. A., Hamburger, V. (Editoren) *Analysis of Development*. Philadelphia PA: Saunders, S. 415-428

Yoshiura, K., Leysens, N. J., Reiter, R., Murray, J. C (1997) Cloning, characterization and genetic mapping of mouse *Hmx-1*, a new homeobox gene. *Genomics* **15** (1) 61-68

Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M. (1996) The Speman organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606

Zheng, J., Gao, W.-Q. (2000a) Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat. Neurosci.* **3**, 580-586

Zheng, J. L., Shou, J., Guillemot, F., Kageyama, R., Gao, W.-Q. (2000b) *Hes1* is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* **127**, 4551-4560

Zine, A., Van De Water, T. R., Ribaupierre, F. (2000) Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* **127**, 3373-3383

Zwilling, E. (1941) The determination of the otic vesicle in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* **86**, 333-342

6. Anhang

Abkürzungen

Abb.:	Abbildung
BMP:	Bone Morphogenetic Protein
bp:	Basenpaare
BCIP:	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bHLH:	basic Helix-Loop-Helix
bidest.:	bidestilliert
BrdU:	Bromdesoxyuracil
BSA:	Bovines Serum Albumin
bzw:	beziehungsweise
cDNA:	copy Desoxyribonukleinsäure
DAB:	Diaminobenzidine
DIG:	Digoxigenin
d.h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DNase:	Deoxyribonuklease
DTT:	Dithiothreitol
E:	Embryonaltag
ED:	Endolymphatischer Dukt
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ES:	Endolymphatischer Sack
ES-Zelle:	embryonale Stammzelle
et al.:	et altera (und andere)
FCS:	Fötales Kälberserum
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FGFR:	Fibroblast Growth Factor Receptor
GET:	Glukose-EDTA-Tris
HBSS:	Hanks´ Balanced Salt Solution
H/E:	Hämatoxylin/Eosin
H.H.:	Hamburger-Hamilton
IGF:	Insuline-like Growth Factor
IPTG:	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
kb:	Kilo-Basenpaare
kD:	Kilo-Dalton

min:	Minute
mRNA:	messenger RNA
NBT:	4-Nitro Blue Tetrazoliumchlorid
NGF:	Nerve Growth Factor
OI:	<i>Oryzias latipes</i> (Medakafisch)
p.a.:	zur Analyse
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PFA:	Paraformaldehyd
POM:	periotisches Mesenchym
RNA:	Ribonukleinsäure
RNase:	Ribonuklease
RNasin:	RNase Inhibitor
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SSC:	Standard-Citratlösung
St.:	Stadium
TE:	Tris-EDTA
TGF:	Transforming Growth Factor
tRNA:	Transfer-Ribonukleinsäure
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling
ü.N.:	über Nacht
WT:	Wildtyp
X-Gal:	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-galactopyranosid
ZNS:	zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Name: Heike Herbrand
Geburtsdatum/-ort: 10. April 1971 in Düsseldorf
Eltern: Bernhard und Johanna Herbrand, geb. Ditsche
Familienstand: verheiratet mit Oliver Pabst seit dem 05.12.1998
Kinder: Philipp Tobias Pabst, geboren am 01.04.1999
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1977-1981 kath. Grundschule Flurstraße, Düsseldorf
1981-1990 „St.-Ursula-Gymnasium“, Düsseldorf

Studium

1990-1996 Studium der Biotechnologie an der TU-Braunschweig
Oktober 1992 Vordiplom, TU-Braunschweig
Dezember 1995 bis April 1996 Diplomarbeit im Labor von Frau PD Dr. Eva Bober an der Technischen Universität Braunschweig mit dem Thema:
„Klonierung der cDNA für das innenohrspezifische Homöoboxgen Nkx-5.1 beim Hühnchen und Untersuchungen zu seinem Expressionsmuster“
Mai 1996 Diplom der Biotechnologie, TU-Braunschweig
Dezember 1996 Braunschweiger Bürgerpreis 1997
August 1996 bis Februar 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Labor von Frau PD Dr. Eva Bober an der Technischen Universität Braunschweig

Publikationen (außerhalb der Doktorarbeit)

Gilbert Meyer-Gauen, Heike Herbrand, Jens Pahnke, Rüdiger Cerff, William Martin (1998) Gene structure, expression in Escherichia coli and biochemical properties of the NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Pinus sylvestris chloroplasts.
Gene 209, 167 – 174

Oliver Pabst, Heike Herbrand, Hans-Henning Arnold (1998) Nkx2-9 is a novel homeobox transcription factor which demarcates ventral domains in the developing mouse CNS. Mech. Dev. 73, 85-93

Oliver Pabst, Heike Herbrand, Naoyuki Takuma, Hans-Henning Arnold (2000) NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. Dev. Genes Evol. 210, 47-50

Dank

Dieser Dank richtet sich an alle Freunde und Kollegen, die auf ihre sehr unterschiedliche Art und Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Eva Bober für die inhaltliche Betreuung der Arbeit und das hohe Maß an Toleranz und Freiheit, das sie mir bei der Durchführung und Zeitplanung ermöglicht hat. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. H.-H. Arnold für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Übernahme des Korreferats und die Teilnahme an der Prüfungskommission. Herrn Prof. N. Käufer danke ich für seine Teilnahme an der Prüfungskommission. Bei Frau Dr. Sarah Guthrie vom Guy's Hospital in London möchte ich mich ganz herzlich für ihre Gastfreundlichkeit und Geduld bedanken, mich in einem mehrwöchigen Laboraufenthalt in verschiedene Transplantations-techniken an Hühnchenembryonen einzuführen. Herrn Prof. Dr. Thomas Braun danke ich für seine stete und kompetente Hilfe bei Problemen aller Art. Sonja Hoffmann, Silke Rinkwitz-Brandt, Thorsten Hadrys und Maja Adamska danke ich für eine freundschaftliche und konstruktive Atmosphäre im Laboralltag und ihre Bereitschaft, es trotz aufdringlichen Eiergeruchs klaglos mit mir in einem Labor auszuhalten. Maja Adamska sei darüber hinaus für die Förderung meiner Englischkenntnisse, viele gemeinsame Hühnchen-Operations-Sitzungen „bench-an-bench“ und geteilten Frust über die Qualität der gelieferten Hühncheneier gedankt. Charlotte Klaue danke ich für ihre Unterstützung in organisatorischen Belangen. Birgit Andrée, Thomas Schlange, André Schneider, Dr. Barbara Winter, Dr. Cristina Cadenas, Dr. Robert Zweigerdt, Dr. Angela Hollnagel, Leonore Faust, Iris Kautzner, Astrid Grudziecki und Stefanie Willenzon danke ich für die stete Auflockerung des Laboralltags, Sekt und Kuchen und viele schöne gemeinsame Stunden.

Ein ganz besonderer Dank gilt - last but not least - meinem Mann Oliver, der mir stets unterstützend und tatkräftig zur Seite stand, und vor allem bei der Meisterung von Computerproblemen unersetzliche Dienste leistete. Zuletzt sei auch unserem Sohn Philipp gedankt, durch den ich auch nach den größten experimentellen Fehlschlägen nie vergessen konnte, daß es auch noch das Leben „draußen“ vom Institut gibt.